

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ
I BIOTECHNOLOGII

Mgr inż. Karolina Bakalorz

Kierunek: Technologia Chemiczna

Dyscyplina: Inżynieria Chemiczna

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Badania przemysłowe nad otrzymywaniem wybranych
chelatów mikroelementowych do zastosowania w rolnictwie**

PROMOTOR: Dr hab. inż. Nikodem Kuźnik Prof. Pol. Śl.

GLIWICE 2022

Podziękowania:

W pierwszej kolejności chciałabym podziękować dr hab. inż. Nikodemowi Kuźnikowi Prof. Pol. Śl., za całą wiedzę i wsparcie, które mi okazał od momentu rozpoczęcia naszej współpracy, trwającej od dnia 18.06.2014, kiedy pierwszy raz przekroczyłam próg laboratorium nr 18. Uważam, że nie można sobie wymarzyć lepszego promotora, a fakt, że jest to moja trzecia praca napisana pod jego opieką tylko to potwierdza.

Dziękuję wszystkim pracownikom Politechniki Śląskiej za lata współpracy. Dr hab. inż. Tomaszowi Krawczykowi Prof. Pol. Śl za wykonywanie widm MS oraz pomoc w ich interpretacji. Koleżankom z laboratorium 18 (Mgr inż. Monice Hebie i Mgr inż. Annie Kastelik-Hryniewieckiej) oraz pozostałym doktorantom za miło spędzony czas, wspólne chwile i dzielenie się wiedzą.

Dziękuję również całemu zespołowi firmy Intermag, za możliwość realizacji tego projektu i okazaną pomoc. Dr inż. Krzysztofowi Ambroziakowi, za wybór mojej osoby do podjęcia współpracy, a także wsparcie podczas całego doktoratu. Dr inż. Adamowi Żabie za bycie najlepszym starszym kolegą, dzielącym się doświadczeniem związanym z doktoratem, pomagającym w trudnych chwilach zwątpienia i możliwość dyskusji na tematy chemiczne i niechemiczne. Mgr Marlenie Grzance za koordynację badań biologicznych, pomoc w interpretacji wyników i dzielenie się szeroką wiedzą z zakresu biologii.

Dziękuję całej firmie Syntal, za udostępnienie aparatury do pracy badawczej oraz praktyczną wiedzę i miłą atmosferę podczas wspólnej pracy.

Na koniec chciałabym podziękować mojej rodzinie i bliskim za wiarę we mnie i wsparcie. W szczególności mojemu chłopakowi Dawidowi Modrokowi za dopingowanie mnie, odciążanie w codziennych obowiązkach i wysłuchiwanie kiedy tego potrzebowałam, a także za sumienne przeczytanie całej pracy i korekty językowe.

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli	5
Wprowadzenie i cel pracy.....	7
Część literaturowa – część jawna	8
1. Biodegradowalność.....	8
2. Omówienie i klasyfikacja poszczególnych ligandów	12
2.1. EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy	12
2.2. DTPA – kwas dietylenotriaminopenta octowy.....	14
2.3. EDDHA - Kwas etylenodiamino-di[(orto-hydroksyfenylo)octowy]	17
2.4. HBED - Kwas <i>N,N'</i> -di(2-hydroksybenzylo)-etylenodiamino- <i>N,N'</i> -dioctowy) 20	
2.5. IDS – kwas iminodibursztynowy	22
2.6. EDDS - Kwas etylenodiamino- <i>N,N'</i> -dibursztynowy	24
3. Znaczenie mikroelementów w uprawie roślin	25
3.1. Żelazo	26
3.1.1. Udział żelaza w reakcjach redoks	27
3.1.2. Żelazo w glebach w zależności od pH.....	29
3.1.3. Transport i przyswajanie żelaza w roślinach	30
3.1.4. Skutki niedoborów żelaza w roślinach	30
3.2. Cynk	32
3.2.1. Znaczenie cynku w roślinach.....	32
3.2.2. Dostępność cynku w zależności od pH.....	33
3.2.3. Przyswajanie i transport cynku w roślinach	33
3.2.4. Skutki niedoborów cynku w roślinach.....	34
3.3. Miedź.....	35
3.3.1. Znaczenie miedzi w roślinach.....	36
3.3.2. Udział miedzi w reakcjach redoks	36

3.3.3.	Miedź w glebach w zależności od pH	37
3.3.4.	Transport i przyswajanie miedzi w roślinach	38
3.3.5.	Skutki niedoborów miedzi w roślinach	38
3.3.6.	Skutki nadmiaru miedzi w roślinach	39
3.4.	Mangan	40
3.4.1.	Znaczenie manganu w roślinach.....	40
3.4.2.	Udział manganu w reakcjach redoks	41
3.4.3.	Mangan w glebach w zależności od pH.....	41
3.4.4.	Transport i przyswajanie manganu w roślinach	42
3.4.5.	Skutki niedoborów manganu w roślinach.....	42
	Wykaz rysunków	44
	Wykaz tabel	45
	Bibliografia	46

Wykaz skrótów i symboli

AAS - Absorpcyjna spektrometria atomowa

AMPSO – Kwas *N*-(1,1-Dimetylo-2-hydroksyetylo)-3-amino-2-hydroksypropanosulfonowy

ATP - Adenozyno-5'-trifosforan

BBCH - skrót pochodzi od niemieckiego Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie i jest skalą wykorzystywaną w państwach UE do identyfikacji faz wzrostu roślin uprawnych

CAPS – Kwas *N*-cykloheksylo-3-aminopropanosulfonowy

DNA – Kwas deoksyrybonukleinowy

DT3A – Kwas dietylotriaminotrioctowy

DTPA – Kwas dietylotriaminopentaoctowy

ED3A – Kwas etylenodiaminotrioctowy

EDDA – Kwas etylenodiaminodioctowy

EDDHA - Kwas etylenodiamino-di[(*orto*-hydroksyfenylo)octowy]

EDDHSa – Kwas etylenodiamino-*N,N'*-di[(2-hydroksy-5-sulfofenylo)octowy]

EDDS - Kwas etylenodiamino-*N,N'*-dibursztynowy

EDTA – Kwas etylenodiaminotetraoctowy

FAC – Cytrynian Amonu i Żelaza(III) CAS: 1185-57-5

HBED - Kwas *N,N'*-di[(2-hydroksybenzylo)-etylenodiamino-*N,N'*-dioctowy]

HEPES – Kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy

ICP-OES – Atomowa spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej

IDS – Kwas iminodibursztynowy

MES – Kwas 2-(*N*-morfolino)etanosulfonowy

MS – Spektrometria mas

NBI – Wskaźnik bilansu azotu

NMR – Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

OECD - Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju

RNA – Kwas rybonukleinowy

TLC – Chromatografia cieńkowarstwowa

UHPLC-MS – Wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas

Terminy takie jak kompleks lub chelat w różnych źródłach mają sprecyzowane definicje i metody klasyfikacji. W niniejszej rozprawie doktorskiej nie przyporządkowywano konkretnych związków do danej grupy, a stosowano oba terminy zamiennie.

Wprowadzenie i cel pracy

Odpowiednie odżywianie roślin uprawnych ma kluczowe znaczenie dla ilości otrzymywanych plonów oraz ich jakości. Nie wszystkie obszary uprawne posiadają gleby zasobne w niezbędne mikro- i makroelementy, co za tym idzie, należy uzupełnić niedobory odpowiednimi środkami. Na rynku nawozowym jest duża konkurencja, producenci prześcigają się w tworzeniu nowych, lepszych preparatów. Regulacje oraz większa świadomość społeczeństwa sprawiają, że mikroodżywcze dodatki, muszą nie tylko zapewniać odpowiednio przyswajalne formy mikroelementów, ale także pozostawać neutralne wobec środowiska. Wiele syntetycznych chelatów wykazuje wysokie stabilności i biodostępność takich mikroelementów jak miedź, mangan, cynk czy żelazo, jednakże większość z nich nie jest biodegradowalna lub konieczne są odpowiednie warunki do rozkładu tych związków. Naturalne cząsteczki z kolei, często nie wykazują aż tak dobrych stałych trwałości ze wspomnianymi pierwiastkami, ale mogą okazać się w przyszłości jedyną alternatywą dla syntetycznych chelatów. Kluczem jest znalezienie złotego środka, między trwałością, a biodegradowalnością otrzymywanych cząsteczek. Trwałość kompleksów jest szczególnie istotna w przypadku gleb wysokozasadowych, ponieważ niezwiązane odpowiednio mikroelementy tworzą w tych warunkach często nierozpuszczalne związki, praktycznie niedostępne dla roślin.

Celem tej pracy było dokonanie przeglądu literaturowego pod kątem sposobów badania biodegradowalności związków stosowanych w rolnictwie a także podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat biodegradowalności powszechnie stosowanych produktów w gospodarstwach rolnych. Ponadto w ramach pracy przeanalizowano i przedstawiono obecnie stosowane ligandy w nawozach, ich sposoby syntezy, w szczególności te objęte prawem patentowym. Zadaniem Doktorantki było także odpowiednio zaznajomienie się i opisanie procesów zachodzących w roślinach z udziałem mikroelementów Cu, Mn, Zn i Fe oraz wskazanie jak wpływają te poszczególne pierwiastki na rozwój roślin. Praktycznym celem badawczym było otrzymanie ligandów oraz stabilnych kompleksów z omawianymi czterema mikroelementami szczególnie w warunkach wysokiego pH. Prace miały prowadzić do otrzymania rozwiązania, które firma InterMag będzie mogła wdrożyć do produkcji w przyszłości. Dlatego badania prowadzono z uwzględnieniem ekonomicznego aspektu, ale także prowadząc różne etapy skalowania pozwalające lepiej dopracować finalny proces.

Część literaturowa – część jawna

1. Biodegradowalność

Pojęcie biodegradowalności może być rozpatrywane na wiele sposobów. Wszystko zależy od przyjętej definicji oraz sposobu badania biodegradowalności. Biodegradacja substancji organicznej może zostać sklasyfikowana jako trzy różne procesy:[1,2]

- Biodegradacja pierwotna – następuje biologiczne przekształcenie pierwotnego związku organicznego i dochodzi do integralnej zmiany struktury molekularnej w cząsteczce
- Biodegradacja ostateczna – następuje biologiczna konwersja związku organicznego do związków nieorganicznych, inaczej zwana mineralizacją
- Akceptowalna biodegradacja – biologiczna zmiana związku organicznego, w wyniku której dochodzi do ograniczenia toksyczności związku lub poprawy jego charakterystycznych cech.

Biodegradacja, poza czynnikami takimi jak: temperatura[3,4], obecność mikroorganizmów[5–7] czy dostęp do kofaktorów metabolicznych takich jak tlen czy składniki odżywcze,[8,9] zależy także od natury cząsteczki ulegającej temu procesowi.[10,11] W odniesieniu do związków kompleksowych należy zaznaczyć, że nie tylko struktura liganda determinuje jego podatność na biodegradację, ale także jon metalu, z którym jest związany. Dla przykładu chelat EDTA z jonami żelaza(III) ulega degradacji fotochemicznej w około 80%, gdzie sam ligand fotodegraduje tylko w około 20-25%. [11,12] Co więcej, w przypadku fotodegradacji istotny wpływ ma głębokość, na jakiej występuje związek w glebie, ponieważ ma to wpływ na dostęp do światła.[13,14]

Spośród elementów strukturalnych można wyszczególnić wpływ obecności w cząsteczce atomów azotu. Im mniejsza ich liczba, tym związek jest bardziej podatny na biodegradację.[15] Nie bez znaczenia jest także rzędowość tych atomów – drugorzędowe atomy azotu będą dużo bardziej podatne na biodegradację, niż trzeciorzędowe atomy.[10,16] Można także wyszczególnić wpływ rodzaju podstawników przy atomach azotu. Poniżej wymieniono podstawniki w kolejności zmniejszającej podatność na biodegradację:[10–12,16]

$-H > -COCH_3 > -CH_3 > -C_2H_5 > -CH_2CH_2OH > CH_2COOH = -NH-CO-CH_3 > N(COCH_3)_2$

= -NH-CH₂-COOH > N(CH₂-COOH)₂. Badania nad biodegradowalnością pozwoliły stworzyć bazę danych m.in. bazę BIODEG będącą składową „Environmental Fate Data Base”. Dzięki informacjom zawartym w tej bazie, można próbować lepiej projektować związki w kierunku ich podatności na biodegradację. Z przedstawionych w bazie informacji wynika, że aby związek był bardziej biodegradowalny, powinny być obecne w nim wiązania estrowe, grupy karboksylowe czy też hydroksylowe. Powinno natomiast unikać się w strukturze halogenów, czwartorzędowych atomów węgla, grup nitrowych i podobnych.[12] Danym podstawnikom zostały w bazie przypisane odpowiednie współczynniki, dzięki którym można próbować przewidzieć zachowanie się zaprojektowanego liganda.

Tabela 1 Elementy strukturalne i ich współczynniki biodegradowalności. Na podstawie publikacji:[12]

Element strukturalny	Dane pobrane z bazy BIODEG	
	Liniiowe współczynniki	Nieliniowe współczynniki
Alifatyczne -OH	0,159	1,118
Alifatyczne NH₂, NH	0,154	1,110
Alifatyczne O=C-OH	0,073	0,643
Trzeciorzędowe aminy	-0,205	-2,223
Czwartorzędowy węgiel	-0,184	-1,723

W publikacjach skupiających się na biodegradowalności związków organicznych najczęściej wykorzystywanymi metodami określenia stopnia biologicznej degradacji są testy opracowane przez OECD (Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju). Instytucja ta zaleca badanie podatności na biodegradację w trzech krokach:[17]

- 1) Należy wykonać test przesiewowy pod kątem gotowości na biodegradację
- 2) Gdy wynik pierwszego testu będzie negatywny, można poddać substancję badaniu symulacyjnemu, które pomoże uzyskać dane opisujące szybkość biodegradacji w środowisku naturalnym. Alternatywnie lub uzupełniająco można zastosować test w zoptymalizowanych warunkach tlenowych, które mogą występować np. w biologicznych oczyszczalniach ścieków
- 3) Przeprowadzenie testu przesiewowego na biodegradację w warunkach beztlenowych.

Spośród wielu metod wybrano do dalszej analizy te, które autorzy publikacji dotyczących niniejszej pracy doktorskiej, stosowali w swoich badaniach. M.in. Test OECD 301B,[11,12,18] OECD 302A,[16,19] czy polskie normy takie jak: PN-88/C-05561[20–24] i PN-72/C-04550.[21,25]

- Test OECD 301B jest jedną z 6 metod wykorzystywaną do badania gotowości na biodegradację, opisywaną jako pierwszy z kroków procedury OECD. Test ten jako miarę biodegradacji wykorzystuje ilość wytworzonego dwutlenku węgla pochodzącego z rozkładu analizowanej substancji organicznej. Badana substancja nie powinna być lotna, a zawartość węgla w substancji powinna być znana lub powinny być znane względne proporcje głównych jej składników. Zaszczepione podłoże z dokładnie znaną zawartością badanej substancji jest przedmuchiwane powietrzem wolnym od dwutlenku węgla. Test najlepiej przeprowadzać w ciemności lub przy rozproszonym świetle. Obserwację biodegradacji kontynuuje się przez 28 dni. Uwolniony dwutlenek węgla jest wychwytywany przez bar lub wodorotlenek sodu i następnie odpowiednio miareczkowany, by wyznaczyć zawartość CO₂. Procent biodegradacji jest wyznaczany według wzoru:[18]

$$\%degradacji = \frac{mg \text{ wyprodukowanego } CO_2}{ThCO_2 * mg \text{ dodanej badanej substancji}} * 100$$

lub

$$\%degradacji = \frac{mg \text{ wyprodukowanego } CO_2}{mg \text{ dodanego } TOC * 3,67} * 100$$

Gdzie:

ThCO₂ – teoretyczna ilość dwutlenku węgla obliczona na podstawie znanej lub zmierzonej zawartości węgla w badanym związku po pełnej mineralizacji; wartość wyrażona jako mg wydzielonego dwutlenku węgla na mg badanego związku.

TOC – Całkowita zawartość węgla organicznego – suma węgla w roztworze i zawieszynie

- Test OECD 302A jest jedną z metod stosowaną w kroku drugim opisanym przez OECD w momencie, gdy badany związek nie wykazuje gotowości na biodegradację w testach z pierwszego kroku. Badana substancja musi być rozpuszczalna w wodzie i nielotna, a zawartość węgla w strukturze powinna być znana. Umieszcza się

badaną substancję razem z osadem czynnym z oczyszczalni w odpowiednim pojemniku do napowietrzania. Następnie napowietrza się układ przez 23 godziny, po czym zatrzymuje się przepływ, czeka aż osad osiądzie i pobiera się ciecz z nad osadu. Do osadu dodaje się kolejną porcję badanego związku i czynności powtarza się. Procent biodegradacji mierzy się poprzez zawartość rozpuszczonego węgla organicznego w supernatancie i oblicza według wzoru:[19]

$$\%biodegradacji = \frac{100 [O_T - (O_t - O_c)]}{O_T}$$

gdzie:

O_T – stężenie badanego związku (w przeliczeniu na węgiel organiczny), dodawanego do osadu czynnego na początku okresu napowietrzania

O_t – stężenie rozpuszczonego węgla organicznego, znajdującego się w supernatancie z badanej próbki pod koniec okresu napowietrzania

O_c – stężenie rozpuszczonego węgla organicznego, znajdującego się w supernatancie próbki kontrolnej

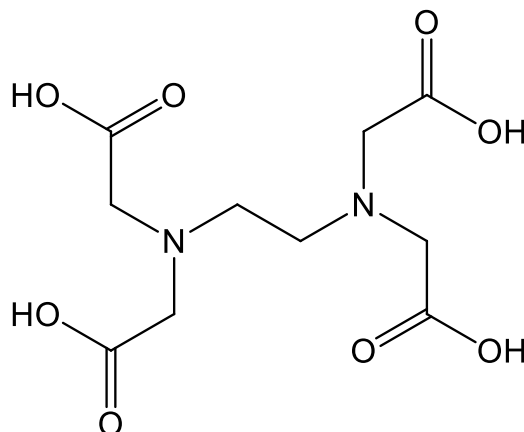
- PN-88/C-05561 obecnie norma widnieje jako wycofana, lecz nie została na jej miejsce wprowadzona żadna nowa procedura. Metoda ta służy wyznaczeniu stopnia biodegradacji tlenowej w środowisku wodnym dla związków organicznych. Do tego celu stosuje się podłoże mineralne zaszczerpione czynnym osadem, do którego wprowadza się badaną substancję. Układ przedmuchuje się tlenem w ciemności i po 20 dniach określa się stopień rozkładu związku, badając stężenie wprowadzonego związku organicznego i chemiczne zapotrzebowanie na tlen. Test można przeprowadzać z dodatkiem lub bez dodatku glukozy.[24]
- PN-72/C-04550 tak jak poprzednia norma, ta również została już wycofana, natomiast została zastąpiona normą o numerze: PN-C-04646:2001. Normy te również wykorzystują test osadu czynnego, natomiast znajdują zastosowanie w badaniu środków powierzchniowo czynnych. Stopień degradacji wyznacza się podobnie jak w powyższej polskiej normie, poprzez analizę stężenia badanej cząsteczki oraz chemicznego zapotrzebowania na tlen.[25,26]

Wiele związków, zwłaszcza tych szeroko stosowanych w rolnictwie, zostało przebadanych pod kątem biodegradowalności. Struktury tych związków można przeanalizować pod

kątem informacji, na temat wpływu różnych elementów strukturalnych na biodegradowalność i porównać do wyników badań eksperymentalnych. Poniżej przedstawiono dane dla poszczególnych ligandów organicznych.

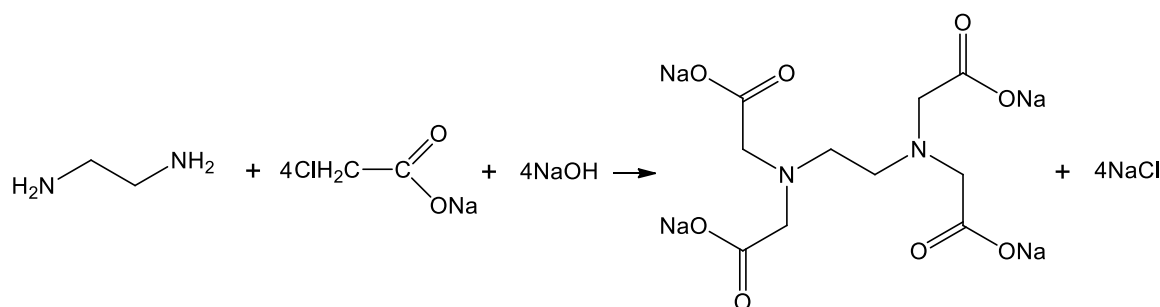
2. Omówienie i klasyfikacja poszczególnych ligandów

2.1. EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy



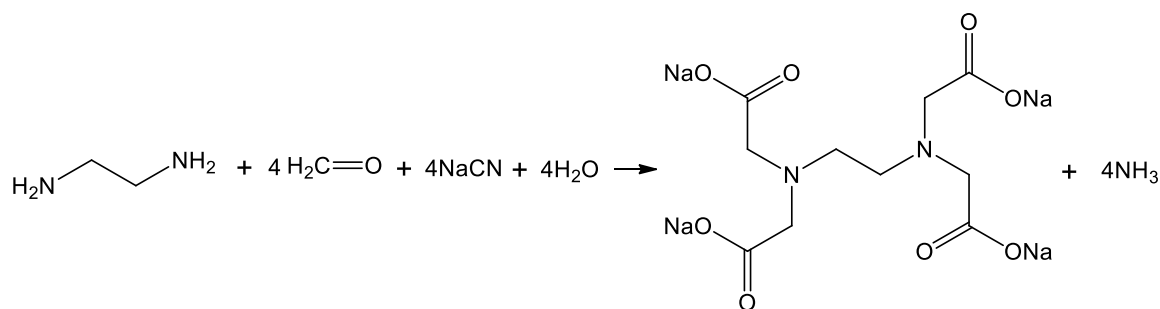
Rys. 1 Struktura kwasu etylenodiaminotetraoctowego

Ligand posiada 6 atomów donorowych, 4 z nich na grupach karboksylowych a pozostałe dwa na atomach azotu. W przypadku związku koordynacyjnego z niedużym jonem metalu, może utworzyć 6-członowy pierścień, lecz w przypadku większych jonów tworzy pierścień tylko 5 członowy.[27,28] Pierwsza synteza EDTA została zaproponowana przez Munza w 1938 r.[29] W syntezie tej ligand jest otrzymywany na drodze reakcji kwasu monochlorooctowego i etylenodiaminy w obecności wodorotlenku sodu.



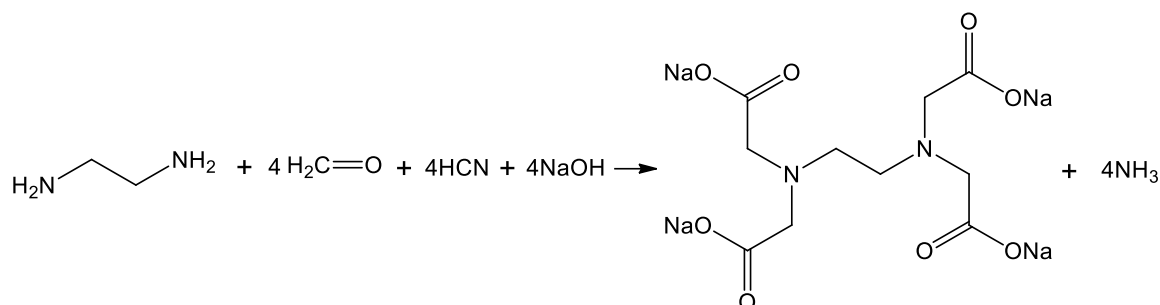
Rys. 2 Schemat syntezy soli sodowej EDTA zaproponowanej przez Munza[29]

Później w 1941 r. nową metodę zaproponował Bersworth.[30] Reakcja ponownie przeprowadzana jest z etylenodiaminą lecz tym razem z cyjankiem sodu oraz formaldehydem w obecności wodorotlenku sodu.



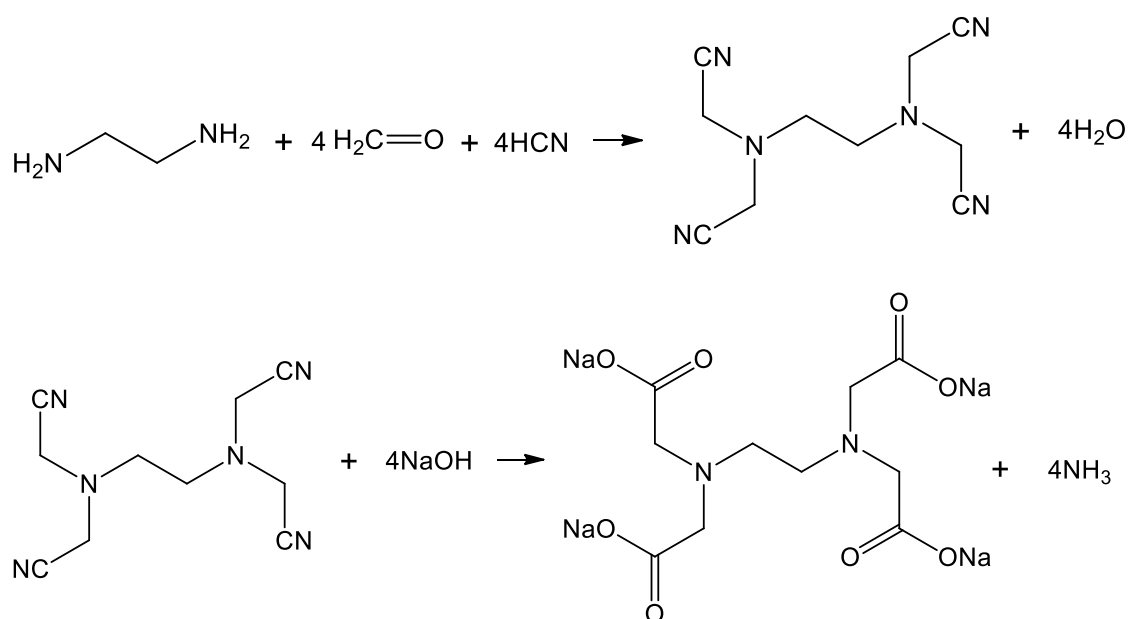
Rys. 3 Schemat syntezy soli sodowej EDTA zaproponowanej przez Berswortha[30]

Podobny proces zastosował Kroll z Dexterem dla firmy Geigy,[31] zgłaszając w 1955 r. swój patent. Różnił się on od procesu Berswortha zastosowaniem kwasu cyjanowodorowego zamiast cyjanku sodu.



Rys. 4 Schemat syntezy soli sodowej EDTA opatentowanej przez Krolla i Dextera[31]

Opisane powyżej sposoby otrzymywania EDTA, a dokładnie jego soli sodowej, odbywają się w jednym etapie. W 1962 r. Singer i Weisberg[32] zaproponowali rozdzielenie etapu cyjanometylacji od hydrolizy i tym samym proces został przekształcony w dwuetapowy.

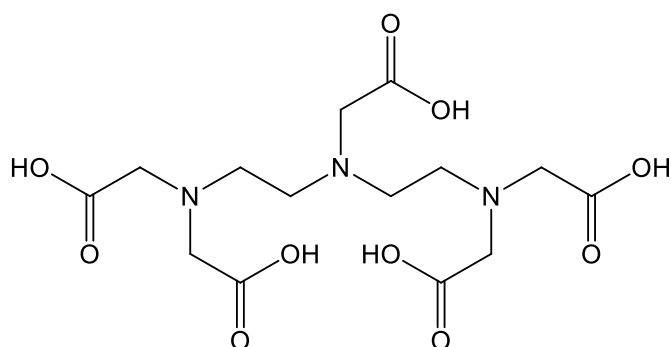


Rys. 5 Schemat dwuetapowej syntezy otrzymywania soli sodowej EDTA zaproponowanej przez Singera i Weisberga[32]

W późniejszych latach powstały propozycje innych metod syntezy EDTA, jednak nie były one stosowane na komercyjną skalę.

EDTA uznaje się za niebiodegradowalną,[33–35] jednakże są badania ukazujące zdolność do częściowej biodegradacji w pewnych warunkach.[33,35] Już w 1975 r. zostały opublikowane badania dotyczące degradacji EDTA przez mikroorganizmy, a także proponowane ścieżki rozkładu tego liganda.[36,37] W 1999 r. Diallo z zespołem przedstawili częściową biodegradację tego liganda, w wyniku procesu biologicznego w odpowiednich warunkach pH i temperatury.[38] Następnie w 2001 r. badacze Rämö i Sillanpää zaprezentowali degradację EDTA za pomocą H_2O_2 , której sprzyjają alkaliczne warunki środowiska.[39] W 2005 r. Ginkel i Geerts donieśli o znaczącej biodegradacji w pełnowymiarowych oczyszczalniach ścieków.[40] Ponieważ w środowisku naturalnym jest mało prawdopodobne, że EDTA będzie występowało w formie wolnego liganda, należy także wziąć pod uwagę możliwości degradacji chelatów poszczególnych metali. Kompleks żelaza(III) w bardzo wysokim stopniu ulega degradacji przez mikroorganizmy (osiągnięto spadek ze stężenia kompleksu 30 mmol/L do 3 mmol/L w obecności bakterii z gatunku *Agrobacterium*).[35] Inne badania pokazują, że chelaty EDTA cynku, miedzi, manganu, wapnia oraz kadmu podobnie ulegają degradacji. Wolniej degradacji ulegał natomiast kompleks niklu. Może to wynikać z niekorzystnego oddziaływania jonów niklu na stosowany szczep bakterii.[36]

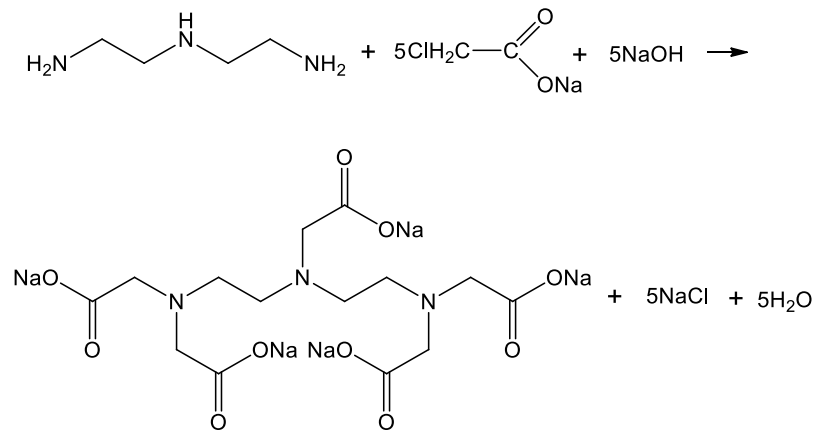
2.2. DTPA – kwas dietylenotriaminopenta octowy



Rys. 6 Struktura kwasu dietylenotriaminopenta octowego

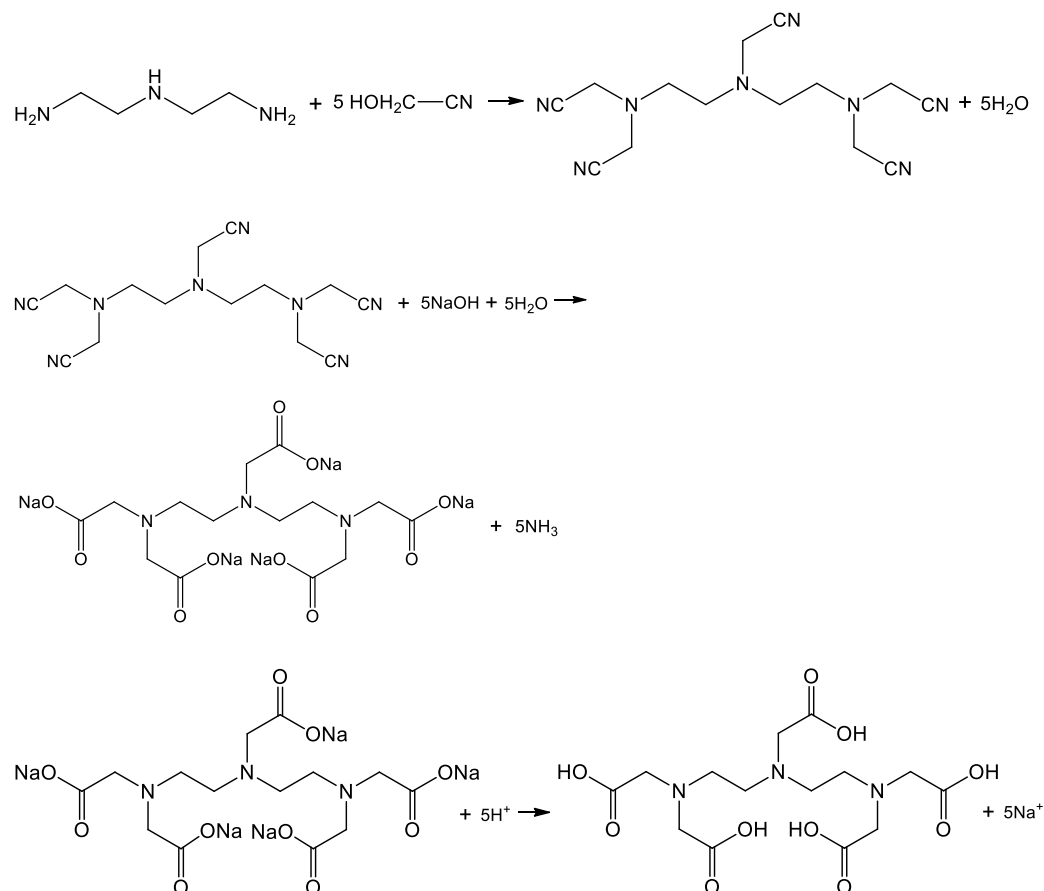
DTPA posiada 8 atomów donorowych, ponieważ posiada aż 5 grup karboksylowych oraz 3 grupy aminowe. Synteza tego liganda odbywa się podobnymi metodami jak EDTA, z tą różnicą, że substratem jest dietylenotriamina. Metody produkcji DTPA, nie są tak szeroko opisane jak EDTA. Najwięcej informacji można znaleźć w chińskich patentach. Jednym ze sposobów otrzymywania jest reakcja między dietylenotriaminą a kwasem

monochlorooctowym lub jego solą. Reakcja ta odbywa się w obecności wodorotlenku sodu, który ma za zadanie neutralizować anion chlorowy.[41]



Rys. 7 Schemat syntezy otrzymywania soli sodowej DTPA opisany w chińskim patencie CN103570571B[41]

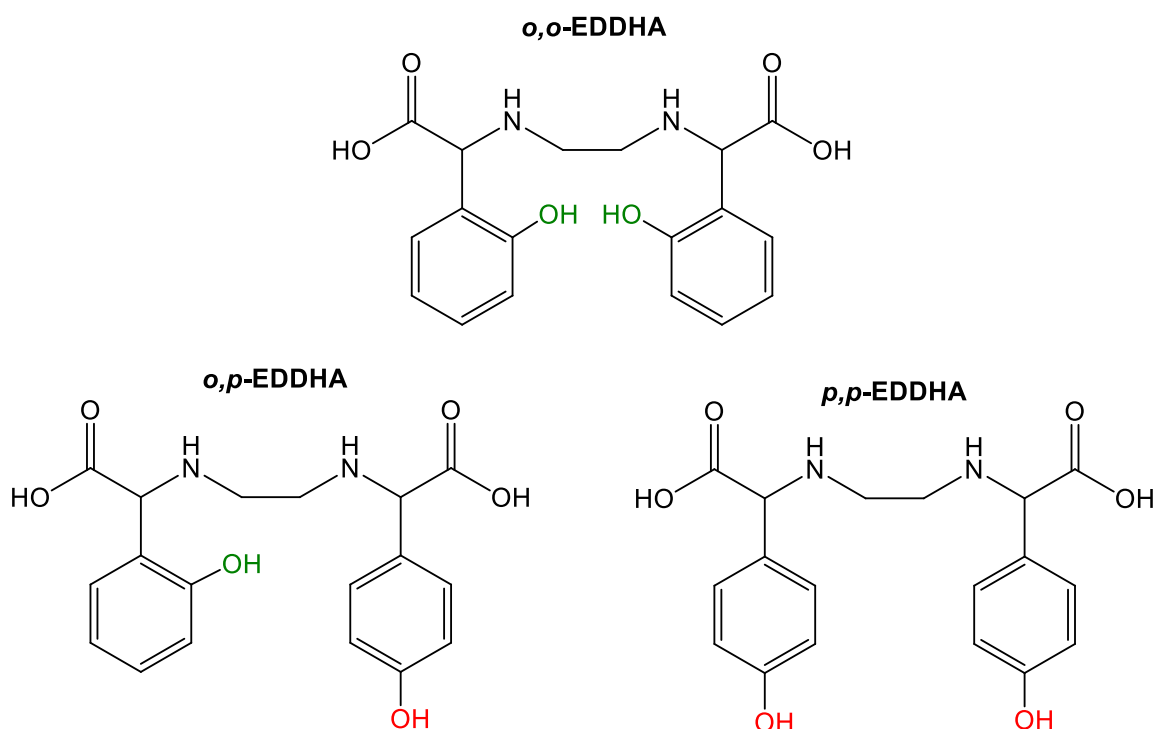
Inną metodą syntezy jest reakcja, w której do dietylenotriaminy przyłączany jest hydroksyacetonitril a następnie produkt tej reakcji traktowany jest wodorotlenkiem sodu i później zakwaszany.[42]



Rys. 8 Trzyetapowy schemat syntezy otrzymywania DTPA opisany w chińskim zgłoszeniu patentowym CN102875400A[42]

DTPA również powszechnie uznaje się za nie biodegradowalne. Tworzy z kolei stabilniejsze chelaty niż EDTA z dwu- i trójwartościowymi jonami metali. Nörtemann w 2005 r. [10] opisuje, że nie ma żadnych danych, aby istniały mikroorganizmy zdolne do wzrostu przy DTPA jako jedynym źródłem energii i węgla. Co więcej, istnieją badania dotyczące negatywnego wpływu tego liganda na drobnoustroje znajdujące się w reaktorze z osadem czynnym.[43,44] Z kolei grupa badaczy z Wrocławia przeprowadziła badania biodegradacji tlenowej w warunkach testu statycznego wg normy: PN-88/C-05561 opublikowane w 2009 r. Z badań tych wynika, że DTPA ulega biodegradacji w około 78%.[20] Ponadto, w badaniach przeprowadzonych w 2004 r.[44] zaobserwowano znaczną fotodegradację (90% w ciągu dwóch tygodni) w jeziorze. Taki rozkład liganda jest tłumaczony wymywaniem żelaza(III) z substancji huminowych i to właśnie kompleks z tym metalem tak dobrze ulega fotodegradacji (podobnie jak w przypadku EDTA). Zauważano także, że związek nie ulega w pełni mineralizacji, lecz degradowuje do prostszych związków takich jak DT3A, ED3A, EDDA czy glicyny.

2.3. EDDHA - Kwas etylenodiamino-di[(orto-hydroksyfenylo)octowy]



Rys. 9 Struktury trzech izomerów EDDHA

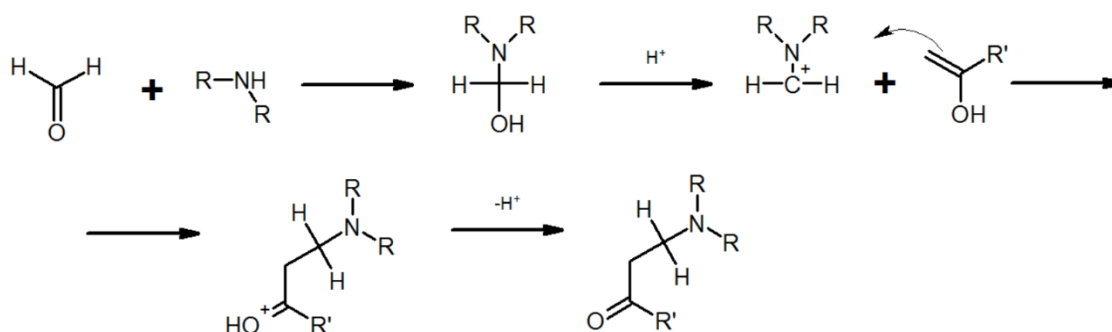
EDDHA jest ligandem posiadającym 6 atomów donorowych: 2 z grup hydroksylowych pochodzących od fenolu, 2 z grup karboksylowych oraz 2 z drugorzędowych atomów azotu. Ponadto posiada chiralne atomy węgla, dlatego może tworzyć izomery optyczne. EDDHA jest jednym z ligandów tworzących bardzo trwałe kompleksy z żelazem. Szczególną jego zaletą jest stabilność utworzonych kompleksów w wysokim pH. W zależności od sposobu otrzymywania tego liganda, mogą, lecz nie muszą tworzyć się izomery strukturalne *orto-orto*, *orto-para*, *para-para*.

Izomerem tworzącym najbardziej stabilne kompleksy jest *orto,orto*. Z kolei izomer *para,para* jest najmniej pożądanym, bo przez jego ułożenie przestrzenne tworzy bardzo niestabilne kompleksy. W 2005 r. przyznany został patent poddający pod dyskusję znaczenie izomeru *orto,para*. [45] McKenzie zaobserwował, że w leczeniu chlorozy ważne jest użycie mieszaniny izomeru *orto,orto* i *orto,para*, najkorzystniej w stosunku 1:0,9. Wynika to z faktu, że izomer *orto,para* szybciej działa na roślinę i wspomaga ją w natychmiastowej walce z niedoborami, z kolei nie jest na tyle stabilny, dlatego za długoterminowy efekt odpowiada stabilniejszy izomer czyli *orto,orto*. Pierwszą syntezę EDDHA opisał w 1957 r. Kroll. [46] Pierwszy etap reakcji przebiegał według mechanizmu redukcyjnego aminowania. Następnie została przeprowadzona reakcja z kwasem

cyjanowodorowym w celu wprowadzenia do struktury grupy karboksylowej. Trzy lata później autor uzyskał patent opisujący syntezę chelatów żelaza EDDHA i jego zastosowania w uprawie roślin.[47]

Ligand ten może być otrzymywany na drodze dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich to wcześniej wspomniany mechanizm redukcyjnego aminowania. W 1959 r. Frost i Freedman również zastosowali ten sposób syntezy omawianego liganda.[48] Co więcej, dokonali szerokiego rozpoznania w kwestii otrzymywania rozmaitych pochodnych: zarówno stosując różne aldehydy aromatyczne jak i stosując inne aminy. Drugi etap reakcji pozostawał niezmienny, gdyż aby wprowadzić do struktury grupę karbonylową, konieczne jest zastosowanie kwasu cyjanowodorowego. To właśnie drugi etap reakcji stanowi w przemyśle największe zagrożenie, ze względu na wysoką toksyczność cyjanków. Dopiero w 2002 r. została opracowana metoda, w której zastąpiono kwas cyjanowodorowy pochodną trimetylosililową i synteza ta stała się dużo bardziej bezpieczna, bo do środowiska reakcji już nie wydzielala się HCN.[49]

Drugą metodą jest synteza według mechanizmu Mannicha (Rys. 10). Jest to metoda cechująca się większą ekonomicznością, ponieważ wykorzystuje ona tańszy fenol zamiast aldehydu salicylowego – substratu w metodzie opisanej powyżej. Pierwszy tę metodę zaproponował Dexter w 1958 r.[50] Opis syntezy można znaleźć w jego patencie. Kolejną zaletą tej drogi reakcji jest fakt, że jest to reakcja tzw. one pot. Został ponadto wykluczony kwas cyjanowodorowy stosowany przez Knolla. Należy także wspomnieć o wadach tej metody, czyli o otrzymywaniu w głównej mierze izomeru *para,para*. [51] Kolejni autorzy stosujący reakcję Mannicha próbowali rozwiązać problem tworzących się niepożądanych izomerów.



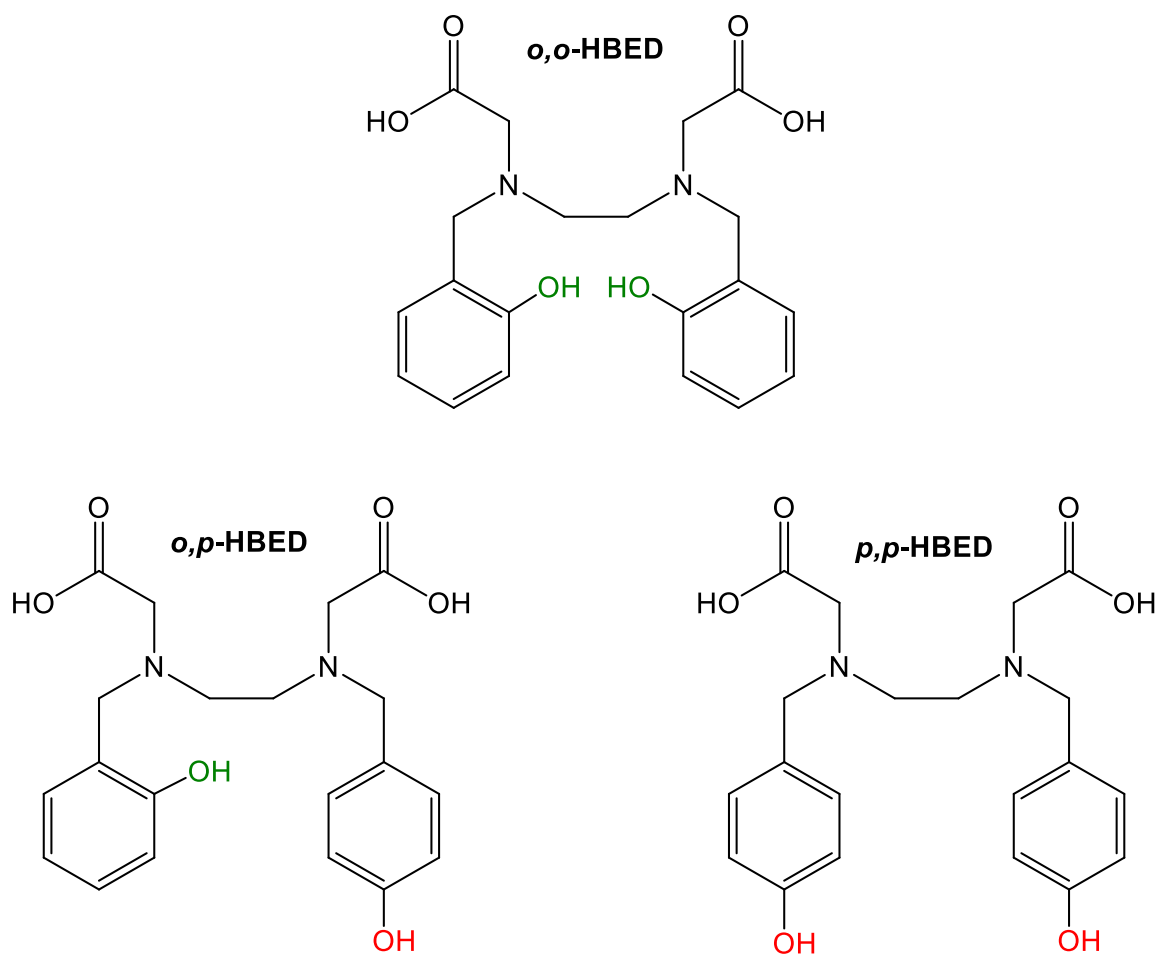
Rys. 10 Mechanizm Mannicha

Kornblum z zespołem w swoich badaniach dowiedli, że środowisko reakcji ma w tym przypadku duże znaczenie. Woda i mieszanina woda-metanol kierowały głównie do

postawienia para. Wykluczenie tych rozpuszczalników i potraktowanie fenolu zarówno jako reagenta i rozpuszczalnika, pozwoliło na uzyskanie wyższych wydajności izomeru *orto,orto*. [52–54] Poza standardową cząsteczką EDDHA, zostało także opracowanych wiele pochodnych tego modelu. Z jednej strony umożliwiało to drogę na obejście istniejących już patentów, a z drugiej dawało możliwości na polepszenie właściwości tego liganda. Co więcej, projektowanie różnych pochodnych wpłynęło pozytywnie na reakcję przeprowadzaną według mechanizmu Mannicha, ponieważ zablokowanie pozycji *para* podstawnikiem powodowało, że nie tworzył się niepożądany izomer. Pierwszy propozycję podstawników w strukturze EDDHA zaproponował Dexter w swoim patencie. [50] Jednym z takich podstawników, stosowanych przy modyfikacjach syntezy, jest grupa sulfonowa znajdująca się przy pierścieniu aromatycznym. W ślad za Dexterem podążyła grupa Petree’ego, która również stosując reakcję Mannicha, opracowała chelaty m.in. EDDHA z grupą sulfonową. [55,56] Później Petree w 1978 r. zaadaptował rozwiązanie Kornbluma dotyczące zastąpienia rozpuszczalnika fenolem i stosując podstawiony fenol sprawił, że nie dochodziło do reakcji ubocznej tworzenia się wiązania węgiel-węgiel w pozycji *para*. [57]

Nie zostało przeprowadzonych i opisanych wiele badań dotyczących biodegradowalności EDDHA. Ze względu na obecność dwóch atomów azotu oraz pierścieni aromatycznych związek ten może być trudno biodegradowalny. Z badań przeprowadzonych przez Klem-Marciniak wynika, że zarówno EDDHA jak i pochodna EDDHSA, nie ulegają tlenowej biodegradacji przeprowadzonej według testu statycznego opisanego przez normę PN-88-C-0561. [58] Z kolei zostało potwierdzone, że tak jak w przypadku innych ligandów poliaminokarboksylowych, jego kompleks z żelazem(III) ulega fotodegradacji. [59] Stopień degradacji zależy od czasu ekspozycji na światło (im dłuży czas tym rozkład wzrasta) oraz od stężenia badanego roztworu (im niższe stężenie tym większy rozkład).

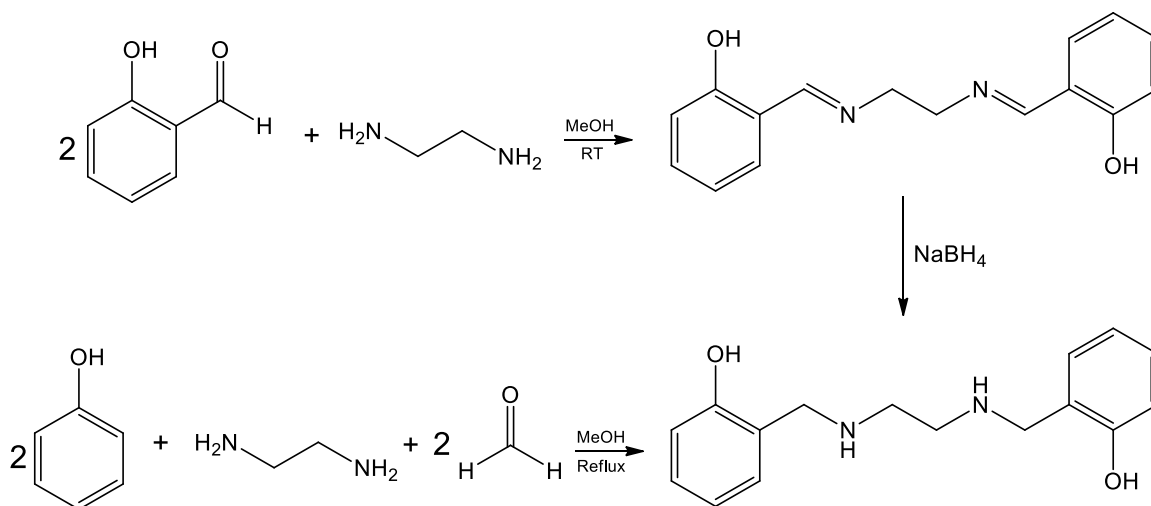
2.4. HBED - Kwas *N,N'*-di(2-hydroksybenzylo)-etylenodiamino-*N,N'*-dioctowy



Rys. 11 Struktury trzech izomerów HBED

Jest to ligand 6 donorowy posiadający 2 trzeciorzędowe atomy azotu, 2 grupy karboksylowe oraz 2 grupy hydroksylowe pochodzące od fenolu. Ligand ten tworzy najtrwalsze kompleksy z jonami żelaza(III), ponieważ stała trwałości tego chelatu wynosi aż 10^{39} . [60] Tak jak w przypadku EDDHA, istnieją 3 izomery tego liganda w zależności od pozycji grupy hydroksylowej przy pierścieniu aromatycznym. Tworzenie się mniej pożądaných izomerów, takich jak *orto,para* i *para, para* zależy w dużej mierze od metody otrzymywania omawianego liganda. W literaturze opisane są głównie 3 drogi syntezy. Pierwsza z nich, będąca zarazem pierwszą opisaną syntezą to metoda otrzymywania HBED poprzez *N*-alkilowanie EDDA bromku *orto*-acetoksybenzylu. [61] Wcześniej została opisana synteza pochodnych HBED przez Krolla i zespół, [62,63] lecz nie opisują oni syntezy niepodstawionej cząsteczki. Wynika to z faktu zastosowania reakcji Mannicha (Rys. 12 dół), w której mogą tworzyć się izomery przy zastosowaniu niepodstawionego fenolu, stąd autorzy używają różnych podstawionych fenoli w pozycjach *para* i *meta*. Podobną metodę syntezy zastosowała w swoim patencie z 2016 r. firma Akzo Nobel. [64]

W tym przypadku autorzy zastosowali już niepodstawiony fenol i dzięki dobranym warunkom syntezy kierują produkt w stronę podstawienia *orto,orto*. Trzecią i ostatnią drogą syntezy opisaną w literaturze jest reakcja redukcyjnego aminowania (Rys. 12 góra). Synteza została opatentowana przez Mckearina w 2001 r.[65] W pierwszym etapie przeprowadzona została reakcja między aldehydem salicylowym oraz etylenodiaminą i powstała imina była redukowana borowodorkiem sodu, a następnie grupa karboksylowa została wprowadzona za pomocą halogenku estru *tert*-butylowego kwasu octowego. Otrzymywanie HBED, zarówno metodą Mannicha jak i redukcyjnego aminowania opisała w 2009 r. w swoim patencie firma ADOB.[66] Całkiem niedawno, bo w 2021 r. wspomniana wcześniej firma, ponownie zagłębiła się w sposób syntezy liganda, tym razem stosując inną kolejność budowania wiązań.[67] Początkowo przeprowadzając syntezę według mechanizmu redukcyjnego aminowania między aldehydem salicylowym a glicyną. Następnie powstałą cząsteczkę łączy się w stosunku 2:1 z 1,2-dichloroetanem poprzez podwójne *N*-alkilowanie.

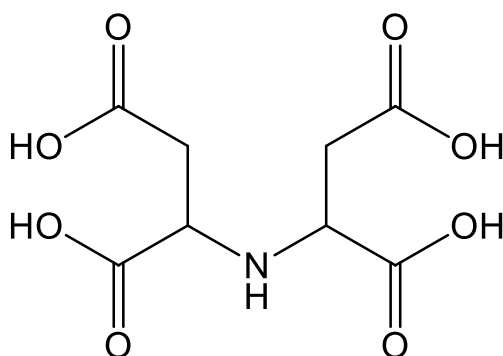


Rys. 12 Schemat otrzymywania szkieletu HBED na drodze redukcyjnego aminowania (u góry) i reakcji Mannicha (na dole)

Biodegradowalność HBED, podobnie jak dla EDDHA, nie została tak szeroko opisana jak dla EDTA. Ze względu na zbliżoną strukturę, można sądzić, że podatność na biodegradowalność oba związki będą mieć zbliżoną. W badaniach Klem-Marciniak[58] stwierdza, że HBED, podobnie jak EDTA, tylko w niewielkim stopniu ulega rozkładowi i powinien ten związek być traktowany jako trudny do rozkładu. Na stronie Europejskiej Agencji Chemikaliów można znaleźć informacje, że HBED-Fe nie wykazuje zdolności do łatwej biodegradacji. W teście zgodnym z wytyczną OECD 301D chelat wykazał mniej niż 10% biodegradacji w przedłużonym do 60 dni czasie inkubacji. Oczekuje się, że chelat

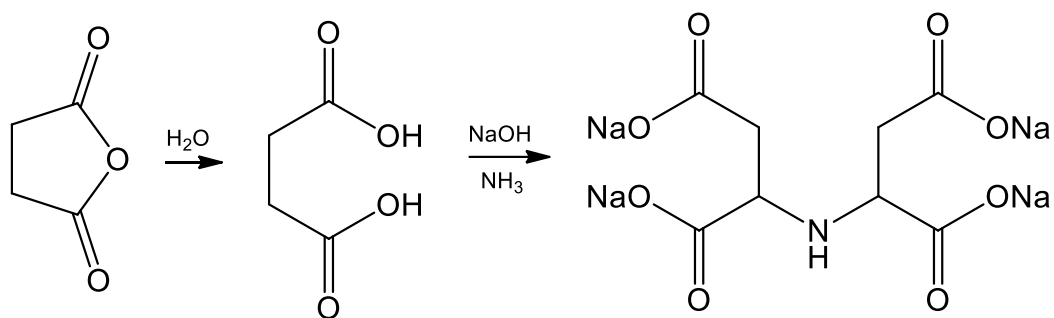
żelaza HBED ma niski potencjał bioakumulacji i ze względu na wysoką rozpuszczalność w wodzie >10 g/l substancja nie będzie akumulowała się w osadach i glebach.[68] Jest to spójne z wynikami badań wymywania ołowiu z gleb przy użyciu różnych ligandów. EDTA najlepiej sprawdził się w wymywaniu ołowiu i utrzymywaniu go w formie rozpuszczonej przez okres 5 dni. HBED z kolei mimo, że pierwotnie zwiększało stężenie rozpuszczonego Pb, to w ciągu 6 godzin ilość rozpuszczonego pierwiastka malała w czasie.[69] W tej samej publikacji przeprowadzono również badania na kukurydzy uprawianej w skażonej ołowiem glebie. Uprawa traktowana EDTA znacząco zwiększyła pobieranie ołowiu przez pędy i korzenie, gdzie w przypadku HBED zaobserwowano zwiększone pobieranie Cu i Mn oraz akumulację manganu w pędach. Te doświadczenia mogą świadczyć, że mimo słabego stopnia biodegradacji, HBED nie będzie wpływał negatywnie na środowisko, jak to może się dzieć w przypadku EDTA.

2.5. IDS – kwas iminodibursztynowy



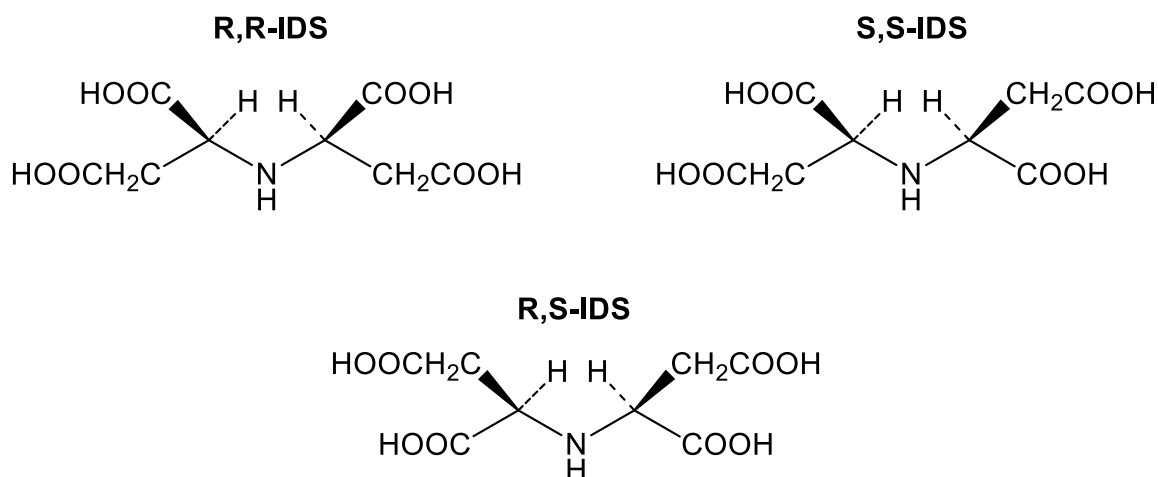
Rys. 13 Struktura kwasu iminodibursztynowego

Ligand posiada 5 atomów donorowych: jeden na atomie azotu a cztery pozostałe na grupach karboksylowych. Pierwsza synteza została opatentowana 1971 r. przez firmę Pfizer.[70] Reakcja polega na połączeniu kwasu maleinowego z amoniakiem w stosunku 1 do 1,5-2,5 mola w temperaturze 60 – 155 °C. Modyfikacji metody syntezy dokonała firma Bayer[71] w 1998 r. uzyskując patent opisujący otrzymywanie IDS'u z bezwodnika maleinowego i amoniaku. Reakcje te są w dużej mierze zbliżone mechanizmem tworzenia się oczekiwanego produktu. W obu wariantach produkt może być otrzymywany w postaci soli sodowej lub potasowej, w zależności od zastosowanego wodorotlenku.



Rys. 14 Schemat syntezy otrzymywania soli sodowej IDS opisany w patencie firmy Bayer[71]

Później w 2004 r. firma ADOB we współpracy z Lanxess (dawniej Bayer) uzyskała patent dotyczący zastosowania chelatów IDS jako nawozów.[72] Ze względu na obecność dwóch centrów stereogenicznych, mogą tworzyć się stereoizomery tego produktu. Mieszanina racemiczna zawiera 25% formy [R,R], 25% formy [S,S] oraz 50% formy [R,S].[73]

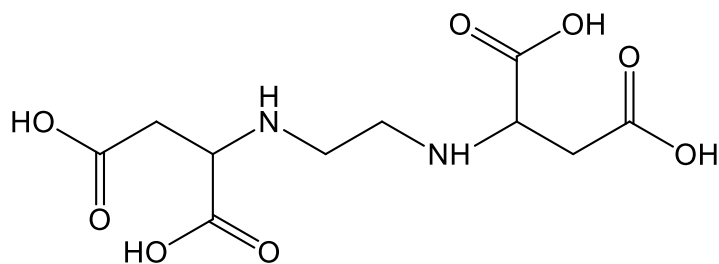


Rys. 15 Struktury trzech stereoizomerów IDS

Te różne formy liganda nie wpływają na stabilność tworzonych kompleksów oraz nie wpływają na biodegradowalność cząsteczki.[74]

Strukturalnie IDS jest podobny do znanego EDTA, z tą różnicą, że posiada tylko jeden atom azotu. Ta cecha sprawia, że ligand mimo, że wykazuje niższe stałe trwałości z poszczególnymi jonami metali,[73] jest interesującym ligandem ze względu na potencjał do biodegradacji.

2.6. EDDS - Kwas etylenodiamino-*N,N'*-dibursztynowy



Rys. 16 Struktura kwasu etylenodiamino-*N,N'*-dibursztynowego

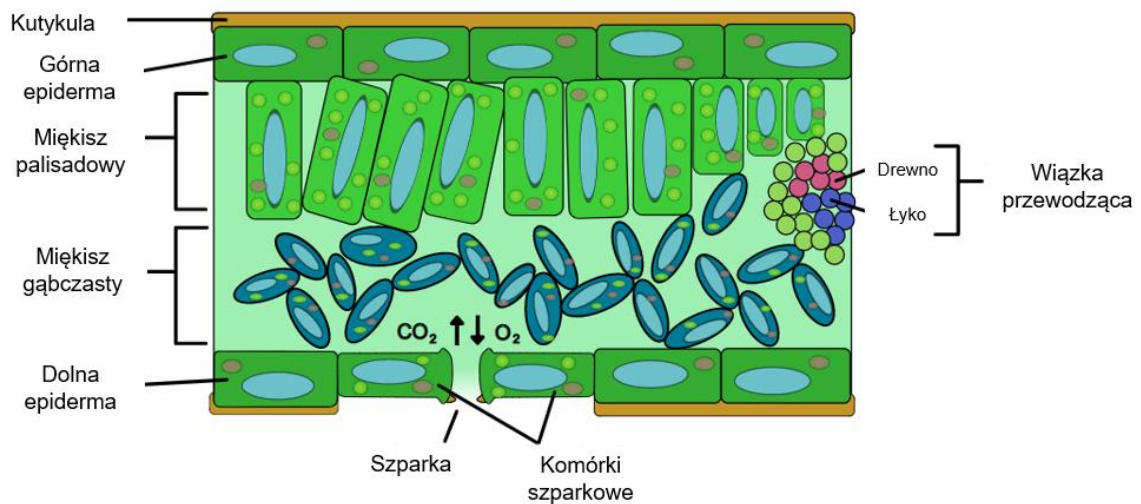
EDDS jest strukturalnym izomerem EDTA. Ponieważ posiada 2 optycznie czynne atomy węgla, może tworzyć 4 różne stereoizomery, choć można stwierdzić, że tworzy 3 różne stereoizomery, ponieważ [R,S] i [S,R] mogą być traktowane jako jeden. W mieszaninie racemicznej izomery występują w takim składzie: [S,S]-25%, [R,R]-25% i [R,S]-50%. [75] W przeciwieństwie do IDS, w przypadku tego liganda, tylko izomer [S,S] jest łatwo biodegradowalny. [76,77] Może to wynikać z faktu, że tylko ten izomer bazuje na naturalnie występującym L-kwasie asparaginowym. [73] To jakie stereoizomery się otrzymuje, zależy od metody syntezy liganda. Jedną z pierwszych opisanych dróg otrzymywania EDDS była ta opatentowana przez Kezeriana i Ramseya w 1964 r. [78] W reakcji tej, bezwodnik maleinowy traktowany jest wodorotlenkiem sodu i dalej utworzona sól sodowa jest traktowana etylenodiaminą, co prowadzi do oczekiwanego produktu. W reakcji tej natomiast tworzą się różne stereoizomery. [79] Dwa lata później Majera opisał syntezę, w której tworzy się tylko jeden z izomerów [S,S]. [80] Polegała ona na zastosowaniu 2 moli kwasu asparaginowego i w obecności NaOH połączeniu ich za pomocą dibromoetanu. Dużym przełomem w syntezie EDDS było opracowanie metody biotechnologicznej, w której ligand może być produkowany przez szczep promieniowców *Amycolatopsis orientalis*. [81,82] Podczas produkcji biotechnologicznej powstaje tylko izomer [S,S], który jest najbardziej pożądanym ze względu na potencjał do biodegradacji. Stałe trwałości z jonami metali są zbliżone do tych z EDTA, [83] natomiast wiele z utworzonych kompleksów traci zdolność do biodegradacji.

3. Znaczenie mikroelementów w uprawie roślin

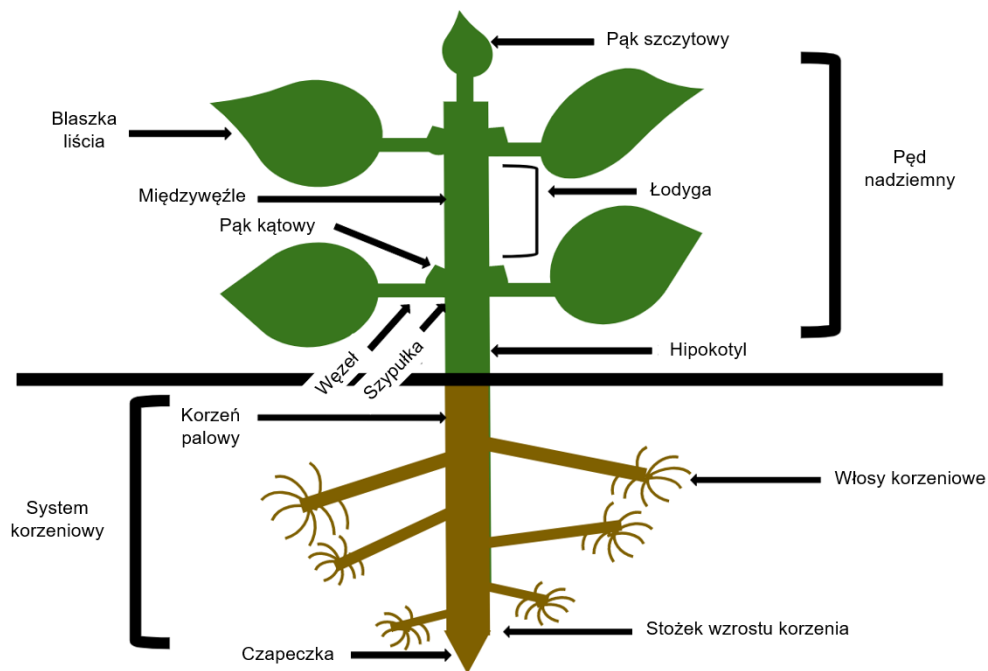
Do prawidłowej uprawy roślin niezbędne jest wiele makro- i mikroelementów. To w jakiej ilości danego pierwiastka należy dostarczyć, zależy od konkretnego gatunku uprawy oraz jej odmiany. Justus von Liebig w XIX zebrał i podsumował informacje dotyczące znaczenia niektórych pierwiastków dla wzrostu roślin.[84–86] Doszedł do wniosków, że pierwiastki takie jak: N, S, P, K, Ca, Mg, Si, Na i Fe są niezbędne do wzrostu roślin. W późniejszych latach kolejni badacze odkrywali kolejne mikroelementy mające niemałe znaczenie w rozwoju roślin. W 2001 r. Mengel i Kirkby[87] zaproponowali podział składników odżywczych na 4 grupy:

- 1) C, H, O, N, S – Główne składniki materiału organicznego
- 2) P, B, Si – Estryfikują grupy alkoholowe w roślinach, estry fosforanowe zaangażowane są w transport energii
- 3) K, Na, Ca, Mg, Mn, Cl – Budują potencjał osmotyczny. Kontrolują przepuszczalności membran i potencjałów elektrochemicznych
- 4) Fe, Cu, Zn, Mo – Składniki enzymów

Można także dokonać podziału składników odżywczych na makroelementy (występujące w roślinie w ilości >0,1% suchej masy) zaliczane do nich N, P, K, Ca, Mg S, a także na mikroelementy (występujące w ilości <0,1% suchej masy) zaliczane są do nich Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, Ni.[88] Nie wszystkie gleby są bogate w odpowiednie zawartości pierwiastków niezbędnych do prawidłowego wzrostu roślin. Z tego względu istnieje konieczność uzupełniania niedoborów przez różnego rodzaju nawozy. Nawożenie może się odbywać zarówno doglebowo jak i dolistnie. W zależności od sposobu aplikowania nawozu, roślina ma możliwość w różny sposób go przyswajać. W dalszej części pracy opisano jakie znaczenie dla roślin mają mikroelementy omawiane w ramach rozprawy, czyli Fe, Zn, Cu i Mn, w jaki sposób pobierane są przez rośliny oraz co wpływa na ich biodostępność. Poniżej przedstawiono ogólny schemat budowy rośliny (Rys. 17 i Rys. 18) i opis poszczególnych elementów, aby łatwiejsze było zrozumienie stosowanej terminologii.



Rys. 17 Ogólny schemat budowy liścia (grafikę wykorzystano na zasadach creative commons)[89]



Rys. 18 Ogólny schemat budowy rośliny (grafikę wykorzystano na zasadach creative commons)[90]

3.1. Żelazo

Żelazo jest drugim, po aluminium, najczęściej występującym metalem w skorupie ziemskiej.[91] Jego średnia zawartość w skorupie ziemskiej wynosi 5%, natomiast w glebach zawartość żelaza wynosi około 3,5%, z czego zdecydowanie większe zawartości można znaleźć w ciężkich gliniastych glebach i niektórych glebach organicznych. W skorupie ziemskiej żelazo występuje głównie w postaci tlenków (np. hematyt $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$; maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; magnetyt Fe_3O_4), uwodnionych tlenków tj Goethyt – $\alpha\text{-FeOOH}$. Ponadto w rudach żelaza można także znaleźć syderyt – FeCO_3 , czy piryt – FeS_2 . [92]

Żelazo występuje też obficie w wielu glebach uprawnych (20 – 40 g/kg).[93] E. Gris już w 1843 r. stwierdził, że Fe jest niezbędnym pierwiastkiem do funkcjonowania roślin, co nastąpiło aż 50 lat wcześniej niż podobne obserwacje dla np. manganu lub cynku.[94] Wykazuje działanie w wielu ważnych procesach, m.in. w fotosyntezie, oddychaniu, biosyntezie chlorofilu, a ponadto jest składnikiem hemu czy klastrów żelazowo-siarkowych.[95]

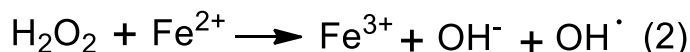
3.1.1. Udział żelaza w reakcjach redoks

Żelazo jako pierwiastek przejściowy, charakteryzuje się względną łatwością zmiany stanu utlenienia z Fe^{2+} na Fe^{3+} i odwrotnie. Ponadto tworzy kompleksy oktaedryczne z różnymi ligandami.[91] W układach tlenowych wiele niskocząsteczkowych chelatów żelaza, a w szczególności wolne żelazo w postaci jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} , wytwarzają reaktywne formy tlenu takie jak rodniki ponadtlenkowe i rodniki hydroksylowe i inne pokrewne związki.[96,97] Poniżej przedstawiono reakcje z udziałem żelaza, w których tworzą się omawiane reaktywne formy tlenu:

- a) Utlenianie jonów żelaza(II) tlenem

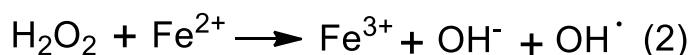


- b) Reakcja Fentona – Reakcja jonów żelaza(II) z nadtlentkiem wodoru. Swojego odkrycia Fenton dokonał podczas opracowania reakcji utleniania kwasu winowego w obecności żelaza.[98]

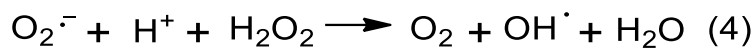
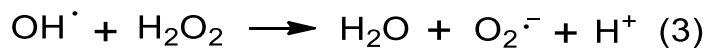


Produktami powyższej reakcji (2) są: jon żelaza(III); jon hydroksylowy oraz rodnik hydroksylowy. Jednakże Fenton nie odkrył mechanizmu stojącego za jego reakcją (2), a jedyne zaobserwował charakterystyczną zmianę koloru na fioletowy oraz zidentyfikował, że wynika to z tworzenia się w reakcji kwasu 2,3-dihydroksymaleinowego, który w połączeniu z solą żelaza, daje fioletowy kolor.[99] Reakcja Fentona dała początek pracy Habera i Waisa, którzy w 1932 r. wyjaśnili mechanizm tej reakcji.[100]

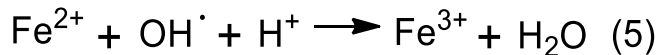
- c) Cykl Habera-Waisa – Badacze opierając się na odkryciach Fentona zaproponowali przebieg reakcji łańcuchowej, w której opisana powyżej reakcja (2) traktowana jest jako inicjująca



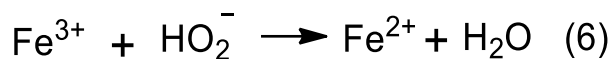
Następnie zachodzą reakcje propagacji:



By w efekcie mogła zajść reakcja terminacji:

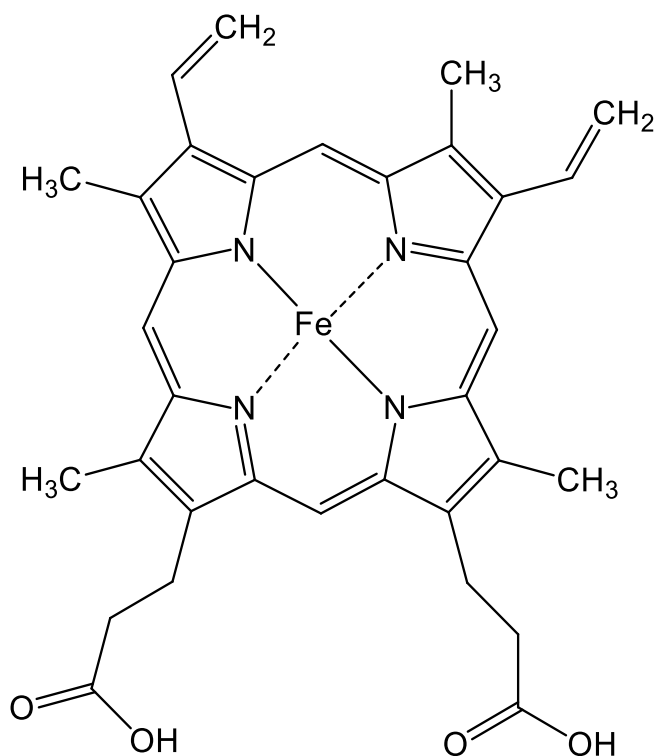


Reakcje (3) i (4) zostały oryginalnie zaproponowane przez Habera i Willstättera w swojej publikacji o działaniu enzymu jakim jest katalaza z 1931 r.[101] Z kolei Weiss dokładnie wyjaśnił w 1937 r.[102] jak działa katalaza, stosując do tego celu omawiany cykl. Enzym wykorzystuje anion nadtlenu wodoru, który redukuje żelazo hemowe z 3 stopnia utlenienia do 2 - reakcja (6),



następnie żelazo(II) redukuje nadtlenek wodoru do rodnika hydroksylowego oraz anionu hydroksylowego zgodnie z reakcją Fentona (2), po czym następują reakcje łańcuchowe (3) i (4), które zużywają cały H_2O_2 . [103]

Rodniki są wysoce toksyczne i odpowiedzialne za peroksydację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych lipidów błonowych i białek. Z tego względu w organizmach żelazo wstępuje w ściśle związanych strukturach np. białek hemowych lub niehemowych. Dzięki temu odwracalne reakcje utleniania i redukcji są kontrolowane, co zapobiega oksydacyjnemu uszkodzeniu komórek.[91] Najbardziej znanymi białkami hemowymi są cytochromy zawierające hemowy kompleks żelaza i porfiryny. Przykład struktury takiego kompleksu przedstawiono na Rys. 19



Rys. 19 Struktura hemu typu b, będąca przykładem cytochromu p450[104]

Cytochromy są składnikami układów redoks w chloroplastach, mitochondriach, a także składnikiem łańcucha redoks w reduktazie azotanowej.[91]

3.1.2. Żelazo w glebach w zależności od pH

W napowietrzanych glebach o fizjologicznym zakresie pH, stężenia jonów Fe³⁺ i Fe²⁺ wynoszą poniżej 10⁻¹⁵ M. Wynika to z faktu tworzenia się wodorotlenków, oksywodorotlenków i tlenków żelaza.[105] Gleby kwaśne zawierają zatem więcej rozpuszczalnego, nieorganicznego żelaza, niż gleby obojętne i wapienne. Niesie to za sobą konsekwencje. Kationy Fe²⁺ w momencie zbyt dużego stężenia w kwaśnych glebach beztlenowych mogą stać się toksyczne, natomiast w dobrze napowietrzonych glebach zasadowych, niskie stężenie rozpuszczalnego, a co za tym idzie przyswajalnego żelaza, może nie spełniać wymagań roślin dla tego metalu.[92] W wyniku niedoborów Fe, spada produkcja oraz jakość plonów i owoców. Te deficyty wstępują w około 30% gleb na całym świecie.[94] Obszary na świecie w których wstępują niedobory żelaza w glebach są stosunkowo rozległe, lecz większość występuje w klimacie suchym i jest związana z występowaniem tam gleb wapiennych, zasadowych lub innych specyficznych np. manganowych.[92]

3.1.3. Transport i przyswajanie żelaza w roślinach

Niektóre gatunki roślin opracowały skuteczne strategie pozyskiwania i pobierania Fe, nawet ze źródeł o niskiej rozpuszczalności tego pierwiastka.[94] Römheld w 1987 r. opracował i opisał dwa różne sposoby pobierania żelaza przez rośliny.[106] Pierwsza ze strategii występuje w gatunkach dwuliściennych i jednoliściennych nietrawiastych, a druga w trawiastych. Strategia pierwsza składa się z dwóch głównych procesów. Wszystkie rośliny wyższe, z wyjątkiem rodziny trawiastych, redukują chelaty żelaza na powierzchni korzenia i następnie absorbują generowane jony żelaza przez błonę plazmatyczną korzenia. Innym mechanizmem jest wydzielanie z korzeni do ryzosfery związków protonowych i fenolowych, co uważa się, że ma pomóc zwiększeniu rozpuszczalności jonów żelaza lub wspomaga zdolność redukcji żelaza na powierzchni korzenia. Z kolei w strategii drugiej pozyskiwanie Fe przez rośliny charakteryzuje się wydzielaniem heksadentatnych substancji chelatujących Fe^{3+} (fitosiderofory, kwasy muginowe) oraz ich specyficznym układem pobierania.[107] W warunkach wystarczającej ilości żelaza wszystkie rośliny redukują chelaty Fe^{3+} i transportują powstałe Fe^{2+} przez błonę plazmatyczną za pośrednictwem systemów transportu żelaza o niskim powinowactwie. Systemy te wciąż nie zostały scharakteryzowane na poziomie molekularnym.[108] Ponadto na przyswajalność żelaza może wpływać występowanie interakcji z innymi pierwiastkami m.in.:

- a) Nadmierne ilości Mn, Ni i Co powodują zmniejszenie wchłaniania i spowolnienie przemieszczania się Fe, co skutkuje spadkiem zawartości chlorofilu
- b) Oddziaływanie Fe–Zn wydaje się być związane z wytrącaniem się franklinitu ($ZnFe_2O_4$), który zmniejsza dostępność obu metali
- c) Interakcje Fe–Ca, zarówno w roślinie, jak i w glebie, są bardzo złożone, ale znaczący wpływ Ca polega na zmniejszeniu dostępności Fe, a tym samym może prowadzić do chlorozy żelazowej w roślinach na glebach wapiennych
- d) Oddziaływania Fe–S skutkują niską dostępnością Fe przy niskiej zawartości S w glebie, podczas gdy wysoka zawartość S może skutkować niską rozpuszczalnością Fe, w zależności od środowiska glebowego[92]

3.1.4. Skutki niedoborów żelaza w roślinach

Krytycznie niskie stężenie żelaza w roślinach mieści się w przedziale 50–150 mg/kg. Ta wartość odnosi się do całkowitej zawartości Fe w roślinie, dlatego ma jedynie ograniczoną wartość dla scharakteryzowania stanu odżywienia żelazem roślin uprawianych na polu.[91]

Odpowiednia zawartość Fe w roślinach jest niezbędna dla roślin, ale należy także pamiętać, że rośliny te są później źródłem tego mikroelementu dla ludzi i zwierząt. Zdolność do wchłaniania żelaza przez rośliny zależy od ich gatunku oraz etapu ich wzrostu. Ogólnie wiadomo, że rośliny strączkowe akumulują więcej Fe niż inne rośliny.[92] Efekty niedoboru żelaza można zobaczyć w wielu roślinach gołym okiem i dla wielu gatunków objawia się w podobny sposób. Między żyłkami liście stają się chlorotyczne (najczęściej żółte), podczas gdy żyłki pozostają zielone.[109]



Rys. 20 Chloroza międzyżyłkowa będąca objawem niedoboru żelaza (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[110]

W przypadku niedoboru Fe, liście mają na ogół niską aktywność fotosyntetyczną, ale pochłaniają więcej energii świetlnej na cząsteczkę chlorofilu, niż jest to wymagane do fotosyntezy, zwłaszcza przy wysokim natężeniu światła. Skutkuje to wysokim ryzykiem fotohamujących i fotooksydacyjnych uszkodzeń liści.[111] Liście z niedoborem żelaza charakteryzują się także niskim stężeniem skrobi i cukrów. Wynika to z redukcji fotosyntezy, która jest charakterystyczną fizjologiczną odpowiedzią roślin na niedobór Fe.[112] W liściach głównym objawem niedoboru Fe jest zahamowanie rozwoju chloroplastów, jednak w przypadku korzeni niedobór Fe wywołuje zmiany morfologiczne i fizjologiczne, które zależą od gatunku rośliny. W gatunkach roślin dwuliściennych i jednoliściennych, z wyjątkiem traw (gatunki trawiaste), niedobór Fe wiąże się z

zahamowaniem wydłużania się korzeni i wzrostem średnicy ich stref wierzchołkowych.[91] Z kolei w gatunkach trawiastych nie występują zmiany morfologiczne i fizjologiczne wywołane przez czynniki fizyczne opisane powyżej. Zamiast tego korzenie uwalniają fitosiderofory jako chelatory Fe(III), które opisano wcześniej.[91]

3.2.Cynk

Sommer i Lipman w 1926 r. wykazali jak duże znaczenie ma cynk dla roślin wyższych i uznali go za niezbędny pierwiastek.[113] Cynk, zaraz po żelazie, jest drugim najliczniej występującym metalem przejściowym w organizmach żywych. Jego zawartość w glebach uprawnych to średnio 65 mg/kg.[114] Omawiany pierwiastek występuje w roztworze gleby w formach wolnych lub skompleksowanych jonów tj: Zn^{2+} , $ZnCl^+$, $ZnOH^+$, $ZnHCO_3^+$, ZnO_2^{2-} , $[Zn(OH)_3]^-$, $ZnCl_3^-$. [115] Metal ten jest natomiast pobierany z gleby głównie jako dwuwartościowy kation Zn^{2+} , a przy wysokim pH prawdopodobnie może być też pobierany jako jednowartościowy kation $ZnOH^+$. [91] Powszechnymi minerałami składającymi się z cynku są z kolei: sfaleryt – α -ZnS; wurcyt – β -ZnS; cynkit – ZnO czy smithsonit – $ZnCO_3$. [92] W odróżnieniu od pozostałych omawianych metali tj. miedzi, manganu czy żelaza, cynk nie posiada zmiennych wartościowości, dlatego w roślinach występuje tylko jako Zn(II). [116] Ponieważ posiada tylko jedną wartościowość, nie bierze udziału w reakcjach redoks. [91] Biodostępność cynku w glebie wzrasta wraz z obniżeniem się pH, z kolei przy obecności twardych kationów tj. Ca^{2+} czy ligandów organicznych, dostępność przyswajalnego cynku spada. [117] Zmiany w metabolizmie roślin wywołane niedoborami cynku są złożone. Ogólnie cynk odgrywa główną rolę w syntezie białek, aktywacji enzymów, reakcjach utleniania i regeneracji oraz metabolizmie węglowodanów. [118] W dużej mierze pierwiastek ten wpływa na ekspresję i regulację genów i mechanizmów obronnych, w związku z czym przyczynia się do wyższej tolerancji roślin na stresowe czynniki środowiskowe. [119]

3.2.1. Znaczenie cynku w roślinach

Metaboliczne funkcje Zn opierają się na jego silnej tendencji do tworzenia tetraedrycznych kompleksów z N-, O-, a zwłaszcza S-ligandami, dzięki którym jest integralnym składnikiem w strukturach enzymów oraz pełni w nich rolę: funkcjonalną (katalityczną), koaktywną i strukturalną. [120,121] Tylko kilka enzymów roślin wyższych zawiera w swojej strukturze cynk, tj. dehydrogenaza alkoholowa, Cu-Zn-SOD, anhidraza

węglanowa, czy polimeraza RNA. W pozostałych przypadkach cynk wiąże enzymy i substraty lub wpływa na konformację enzymu i/lub substratów.[116] Udział cynku jest obserwowany w ramach takich procesów w roślinie jak: metabolizm węglowodanów, białek czy auksyn, fotosynteza, konwersja cukrów na skrobię, tworzenie pyłków, utrzymanie integralności błon biologicznych. Pierwiastek ten wpływa również na odporność wobec infekcji spowodowanych niektórymi patogenami.[122–125] Może to wynikać z pozytywnego wpływu Zn na poziomy białek, chlorofilu oraz kwasu abscynowego, co zostało zaobserwowane w sadzonkach fasoli.[126] Oprócz indukowania odporności u roślin uważa się również, że Zn może zwiększać tolerancję na suchą i upalną pogodę, co zostało zaobserwowane w roślinach tj. słonecznik czy czerwona kapusta.[127,128]

3.2.2. Dostępność cynku w zależności od pH

Dostępność cynku w dużym stopniu zależy od pH gleby. Gdy pH gleby osiąga wartość powyżej 6, dostępność cynku jest dość niska. Stężenie cynku w glebie w zakresie od pH 5 do pH 8 spada z 10^{-4} M do 10^{-10} M.[129] Wynika to z mniejszej rozpuszczalności tego pierwiastka w glebach alkalicznych.[130] Niską dostępność cynku w warunkach zasadowych przypisuje się wytrącaniu się wodorotlenków lub węglanów.[131,132] Proces wapnowania gleb kwaśnych może znacząco zmniejszyć zdolność do przyswajania cynku, szczególnie w glebach o wysokim stężeniu fosforu, co może skutkować niedoborami tego pierwiastka.[122,133]

3.2.3. Przyswajanie i transport cynku w roślinach

Sposób pobierania cynku różni się w zależności od gatunku rośliny, ale jest determinowany przez skład i stężenie pożywki wzrostowej. Pierwiastek jest wychwytywany w postaci kationu dwuwartościowego lub w formie kompleksu z ligandami organicznymi. Mikroelement ten pobierany jest przez korzenie i następnie, poprzez ksylem, zasila dalej pędy.[92,134] Translokacja tego metalu do ksylemu korzenia odbywa się przez symplast i apoplast.[134] Wysokie poziomy pierwiastka zostały wykryte również we floemie, co oznacza, że jest on przemieszczany zarówno przez tkanki ksylemu, jak i łyka.[135,136] Rozłożenie cynku w różnych częściach roślin wygląda następująco: korzenie > liście > gałęzie > pień. Małe korzenie boczne zatrzymują więcej mikroelementu niż pozostałe części rośliny.[92] Można także znaleźć informacje, że pierwiastek ten jest skoncentrowany w chloroplastach niektórych roślin (np. szpinaku), a także może się również gromadzić w płynach z wakuoli i błonach komórkowych.[137] Ze względu na

sprzeczne raporty, trudno stwierdzić, czy wychwyt Zn jest procesem pasywnym czy aktywnym. Wynik badań przeprowadzanych na jęczmieniu w warunkach beztlenowych, przy obniżonej temperaturze i czynnikach rozprzegających metabolizm, wskazują, że pobieranie tego metalu jest procesem aktywnym, gdyż w zadanych warunkach następuje zmniejszenie wchłaniania cynku w korzeniach rośliny.[138] Stwierdzono również, że wychwyt kationu nie jest procesem metabolicznie zależnym, ponieważ nie reaguje na inhibitory metabolizmu.[123] Mobilność cynku, w stosunku do wysoce ruchliwych pierwiastków tj. potas i fosfor oraz bardzo mało ruchliwego wapnia określa się na pośrednią.[91,92]

3.2.4. Skutki niedoborów cynku w roślinach

Poziom niedoboru cynku w roślinach określa się w przedziale 10-20 mg/kg. Wartości te mogą się znacznie różnić, ponieważ niedobór cynku może zmieniać się w zależności od konkretnych gatunków, a także może obrazować oddziaływanie tego metalu z innymi pierwiastkami w tkankach rośliny.[92] W wyniku niedoborów cynku obniża się ilość aminokwasów nagromadzonych w tkankach roślin, a także zmniejsza się synteza białek.[118] Występowanie niedoborów cynku jest dość powszechne, natomiast mimo tego ich diagnoza jest dość złożona i by wykonać ją poprawnie, ocenia się zarówno roślinę na podstawie wizualnej, jak i analizy chemicznej, a także dokonuje się badania gleby.[92] Nambiar i Motiramani[139] przedstawili test diagnostyczny generujący obiecujące wyniki, w ramach którego analizuje się stosunek żelaza do cynku w roślinie. Test ten pozwala na wykrycie nawet ukrytych niedoborów cynku. Wpływ na występowanie niedoboru tego mikroelementu w roślinie ma, poza jego podstawowym niskim poziomem w glebie, szereg innych czynników np. inaktywacja cynku w glebie spowodowana mikroorganizmami, ograniczona strefa korzeniowa rośliny czy efekty antagonistyczne.[125] Ze względu na trudność w translokacji cynku w roślinach, jego niedobór występuje na ogół w młodszych liściach. Z tego powodu efektem niedoboru są słabo rozwinięte i niskie uprawy, co jest wynikiem niedostatecznej podaży hormonu wzrostu.[115] Jednymi z najbardziej charakterystycznych, wizualnych objawów niedoborów cynku u roślin dwuliściennych są krótkie międzywęzły (odległości pomiędzy kolejnymi liśćmi) oraz zmniejszenie ekspansji liści. Zahamowanie wzrostu rośliny łączy się często także z chlorozą najmłodszych liści (Rys. 21). Z kolei u roślin jednoliściennych można zaobserwować, wzdłuż nerwu głównego liści, chlorotyczne pasma z czerwonymi, plamistymi przebarwieniami.[116]



Rys. 21 Objawy niedoborów cynku na liściach herbaty, widoczne na młodych liściach (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[140]

Ponadto zahamowanie wzrostu i szczególna nekroza starszych liści nasila się wraz z wysokim natężeniem światła, co sugeruje udział rodników ponadtlenkowych w rozwoju objawów niedoboru cynku.[141] Oprócz wymienionych wcześniej objawów niedoboru Zn, można jeszcze zaobserwować zwijanie się blaszki liściowej do wewnątrz, a przy poważnych niedoborach następuje martwica wierzchołka korzeni.[134]

3.3.Miedź

Miedź jest 25-tym najpowszechniej występującym składnikiem skorupy ziemskiej i trzecim najczęściej używanym metalem na świecie.[142] Jej zawartość w skorupie ziemskiej mieści w stężeniach między 25 a 75 mg/kg, a średnio to 55 mg/kg.[92] W latach 30-tych XX wieku omawiany pierwiastek został uznany jako niezbędny składnik odżywczy roślin.[143,144] Jest niezbędny nie tylko dla roślin, ale także dla ludzi i zwierząt, natomiast powyżej optymalnych dawek staje się również toksyczny.[145] Dla tkanek roślin optymalna ilość miedzi mieści się w przedziale 5-30 mg/kg.[146] Miedź jest pierwiastkiem przejściowym, biorącym udział w reakcjach redoks. Odgrywa rolę w fotosyntezie,

oddychaniu, metabolizmie C i N oraz ochronie przed stresem oksydacyjnym. Uczestniczy, podobnie jak żelazo, w reakcjach przeniesienia elektronu. Dwuwartościowy metal jest łatwo redukowany do jednowartościowej formy, która jest niestabilna.[91] Na pobieranie miedzi przez rośliny ma wpływ zarówno pH gleby, jak i jej stężenie w niej, a także dominujące chemiczne formy.[147] Mikroelement wykazuje duże powinowactwo do grup peptydowych i sulfhydrylowych, a tym samym do białek bogatych w cysteinę. Wykazuje także powinowactwo do grup karboksylowych oraz fenolowych.[91] To, do jakiej grupy wykazuje większe powinowactwo zależy od stopnia utlenienia w jakiej występuje. Kation Cu^{2+} często jest wiązany przez azot występujący w histydynowych łańcuchach bocznych, z kolei Cu^+ chętniej łączy się z siarką występującą właśnie w cysteinie lub metioninie.[148] Powszechnie występujące minerały zawierające miedź to: chalkopiryt – CuFeS_2 ; bornit – Cu_5FeS_4 ; chalkozyn – Cu_2S czy kowelin – CuS . Ponad 98% miedzi występuje w roślinie w formie skompleksowanej, podczas gdy stężenia wolnych kationów są niezwykle niskie w cytoplazmie.[91] W glebie z kolei pierwiastek ten najczęściej występuje w formie jonu $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ zaadsorbowanego na ilastych minerałach lub współstrącany na innych mineralnych i organicznych składnikach gleby.[92]

3.3.1. Znaczenie miedzi w roślinach

Istotną cechą Cu^+ jest zdolność do wiązania małych cząsteczek takich jak O_2 , jako ligandów. Dzięki temu miedź pełni rolę kofaktora wielu oksydaz np. oksydazy cytochromu c, oksydazy askorbinowej czy polifenolowej. Jony miedzi działają także jako kofaktor w enzymie takim jak Cu/Zn dysmutaza ponadtlenkowa.[148] Mikroelement odgrywa kluczową funkcję w asymilacji CO_2 oraz w produkcji ATP.[149] Na poziomie komórkowym pierwiastek odgrywa zasadniczą rolę w metabolizmie ściany komórkowej, sygnalizowaniu transkrypcji białek, fosforylacji oksydacyjnej oraz mobilizacji żelaza i biogenezie kofaktora molibdenu. Ponadto miedź jest także elementem strukturalnym w niektórych metaloproteinach, z których wiele bierze udział w transporcie elektronów w chloroplastach i mitochondriach, a także jest odpowiedzią na stres oksydacyjny.[148] Cu jest niezbędna wewnątrz komórki roślinnej w co najmniej sześciu miejscach: cytozolu, retikulum endoplazmatycznym, wewnętrznej błonie mitochondrialnej, zrębie chloroplastów, świetle tylakoidów i apoplastach.[91]

3.3.2. Udział miedzi w reakcjach redoks

Właściwości redoks miedzi sprawiają, że jest ona niezbędnym pierwiastkiem, ale zarazem przyczyniają się do jej nieodłącznej toksyczności. Cykl redoks między Cu^{2+} , a Cu^+ może

katalizować produkcję wysoce toksycznych rodników hydroksylowych, co prowadzi do uszkodzenia komórek na poziomie lipidów, błon, kwasów nukleinowych, białek i innych biomolekuł.[150] Z pozytywnych cech, wynikających z charakteru redoks, Cu wspomaga wytwarzanie nadtlenu wodoru, który jest cząsteczką sygnalizacyjną dla różnych procesów i może modulować wzrost i rozwój roślin.[151] Dlatego też, poniżej optymalnej ilości omawianego pierwiastka, obserwuje się znaczne zmniejszenie wzrostu i produktywności roślin, co może pośrednio wynikać ze zmniejszonej produkcji H_2O_2 . [152] Większość funkcji miedzi jako składnika odżywczego dla roślin opiera się na jej enzymatycznie związanej formie, która katalizuje reakcje redoks. Dla przykładu, w reakcjach redoks końcowych oksydaz enzymy miedzio-zależne reagują bezpośrednio z tlenem cząsteczkowym. Wynika z tego, że końcowe utlenianie w żywych komórkach jest katalizowane przez miedź, a nie przez żelazo.[91]

3.3.3. Miedź w glebach w zależności od pH

Wpływ pH na mobilność miedzi w glebie silnie zależy od tego, w jakiej formie występuje i jakie tworzy związki.[92] Podaje się, że przy pH poniżej 9, najbardziej dominującą formą jest Cu^{2+} , a z kolei przy pH powyżej 6,9, zaczyna dominować forma wodorotlenkowa, czyli $Cu(OH)_2$. [153] Ponadto zauważono, że ogólna rozpuszczalność, zarówno kationowych jak i anionowych form miedzi, spada przy pH ok. 7-8. Szacuje się, że produkty hydrolizy, takie jak $CuOH^+$ czy $Cu_2(OH)_2^{2+}$, są najbardziej znaczące poniżej pH 7, z kolei powyżej pH 8, istotniejsze stają się anionowe hydroksykompleksy takie jak: $Cu(OH)_3^-$ czy $Cu(OH)_4^{2-}$. [92] Ponadto w glebach wapiennych obserwuje się także wytrącanie $CuCO_3$, co znacząco wpływa na aktywność tego mikroelementu w roztworze glebowym.[154] Można, mimo wszystko, zaobserwować większą mobilność chemiczną miedzi, która może być związana z wydzielaniem fitosideroforów, co prowadzi do większego jej poboru przez rośliny.[148,155] Ogólnie mobilność tego pierwiastka jest zwykle niższa w lekko zasadowym pH, a rośnie zarówno w warunkach kwaśnych jak i silnie zasadowych.[145] Przy kwaśnym pH rozpuszczona miedź zwiększa się z powodu słabszej adsorpcji i tym samym zwiększa się aktywność jej wolnych jonów. Z kolei, wraz ze wzrostem pH pojawia się konkurencja adsorpcyjna między materią organiczną w fazie stałej a rozpuszczonym węglem organicznym, co prowadzi także do wzrostu stężenia Cu w roztworze glebowym, ze względu na wzrost rozpuszczonego węgla organicznego.[156] pH gleby znacząco wpływa na procesy sorpcji i desorpcji pierwiastków chemicznych, w tym miedzi.[157]

3.3.4. Transport i przyswajanie miedzi w roślinach

Rośliny absorbują miedź z gleby głównie w postaci Cu^{2+} , ponieważ ma wysokie powinowactwo do wiązania z materią organiczną w porównaniu do innych form Cu.[158] Podobnie jak inne jony metali, miedź pobierana jest z gleby przez korzenie.[159] Podczas gdy pierwiastek ten wnika do rośliny, staje się po części nieruchomy.[147] Z tego względu miedź gromadzi się przede wszystkim w korzeniach roślin i w niedużej ilości transportuje się do części naziemnych.[158,160] Sposób pobierania i transportu miedzi do komórek i wewnątrz komórek nie został dobrze poznany. W roślinach zidentyfikowano kilka rodzin transporterów metali ciężkich zaangażowanych w homeostazę wewnątrzkomórkową. Niewiele wyników uzyskano w odniesieniu do transportu Cu na duże odległości lub procesów transportowych zachodzących na poziomie korzeni.[148] Białka transportujące ten pierwiastek należą do różnych rodzin, np. białek ułatwiających dyfuzję kationów, białek ATPazy metali ciężkich czy transporterów regulowanych przez cynk.[161] Wiadomo także, że na zwiększenie mobilności Cu wpływa wydzielanie przez rośliny fitosideroforów, lecz nie ma dowodów na pobieranie kompleksów Cu z fitosideroforami przez korzenie roślin.[148,155] W transporcie Cu^{2+} do naziemnych części roślin pośredniczą specyficzne chelatory i transportery metali. Donosi się również, że aminokwasy tworzą stabilne kompleksy z miedzią w soku ksylemu i tym samym ułatwiają jej translokację.[162] Nikotianamina i histydyna wykazują najwyższą zdolność do wiązania miedzi, co czyni je idealnymi ligandami do chelatowania jej w ksylemie oraz przenoszenia ich do tkanek pędów.[158]

3.3.5. Skutki niedoborów miedzi w roślinach

Do normalnego wzrostu i rozwoju rośliny wymagają miedzi. Gdy nie jest ona dostępna, zaczynają występować specyficzne objawy niedoborów. Występują one głównie w młodych liściach oraz na częściach rozrodczych rośliny.[148] Brak dostępności miedzi obserwuje się często w glebach żelazolitycznych, żelazistych glebach gruboziarnistych czy wapiennych, a także na glebach bogatych w materię organiczną, ponieważ wtedy pierwiastek ten łączy się substancjami organicznymi.[163] Krytyczny poziom niedoboru miedzi w wegetatywnych częściach roślin mieści się w zakresie 1-5 $\mu\text{g/g}$ w przeliczeniu na suchą masę. Dokładnie zależy to od gatunku rośliny, konkretnego organu i stadium rozwojowego rośliny, a także podaży azotu.[164] Rośliny uprawiane w warunkach wysokiej podaży azotu wymagają znacznie więcej omawianego mikroelementu.[148] Według dostępnej wiedzy, w odpowiedzi na niedobór miedzi można wyróżnić co najmniej

trzy różne strategie molekularne, które zachodzą. Pierwsza ma na celu poprawę akwizycji metali i obejmuje zwiększoną ekspresję reduktaz metali i transporterów o wysokim powinowactwie. Druga polega na ustaleniu priorytetów wykorzystania metali w kluczowych i nieistotnych szlakach. Jeśli metaloproteiny z różnymi ligandami metalicznymi pełnią podobne lub nakładające się funkcje, określoną metaloproteinę można zastąpić inną, gdy jej metal jest niedostateczny.[165] Wynikiem niedoboru miedzi jest zahamowanie wzrostu, zniekształcenie młodych liści, a także chloroza i nekroza (Rys. 22), zaczynająca się często od merystemu wierzchołkowego rozciągającego się wzdłuż krawędzi liści oraz następuje widoczne bieleńie młodych liści.[91]



Rys. 22 Nekroza na liściach brokuła, będąca wynikiem niedoboru miedzi (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[166]

3.3.6. Skutki nadmiaru miedzi w roślinach

Nadmiar miedzi tak jak i niedobór, nie jest korzystny dla rośliny. Nadmiar Cu może stać się bardzo toksyczny, powodując objawy takie jak chloroza czy martwica, a nawet zahamowanie wzrostu korzeni i pędów. Z kolei na poziomie komórkowym nadmiar tego pierwiastka może dezaktywować i zaburzać strukturę białek w wyniku nieuniknionego wiązania się z nimi.[148] Ponadto przy nadmiarze omawianego mikroelementu dochodzi także do zaburzenia kluczowych składników komórkowych, takich jak lipidy, DNA i RNA. Toksyczność miedzi dla makrocząsteczek komórkowych może być pośrednia i wynikać z

powstawania reaktywnych form tlenu.[167,168] Poza zakłócaniem wzrostu i rozwoju roślin, nadmiar Cu wpływa także negatywnie na pobieranie innych niezbędnych składników odżywczych oraz zakłóca fotosyntezę poprzez zmniejszenie zawartości pigmentu.[169,170]

3.4. Mangan

Znaczenie manganu we wzroście roślin zdefiniował pierwszy McHargue w 1919 r.[171] Rozpoczęto później badania nad zapotrzebowaniem na ten mikroelement wśród roślin i próbowano przypisać objawy niedoborów manganu. Badacze skupiali się także na roli manganu w walce ze szkodnikami czy odpornością na choroby.[147] Mangan jest jednym z najpowszechniej występującym pierwiastkiem w litosferze (zawartość w skałach waha się od 350 – 2000 mg/kg). Z kolei w glebach na całym świecie zawartości manganu mieszczą się w wartościach 411 – 550 mg/kg. Występuje w postaci minerałów takich jak: piroluzyt – β - MnO_2 ; manganit – γ - $MnOOH$; hausmanit – Mn_3O_4 czy $MnCO_3$. [92] Mangan może występować na stopniach utlenienia: I, II, III, IV, VI i VII. Natomiast w układach biologicznych występuje głównie na II, III i IV stopniu utlenienia. Mangan na II i IV stopniu utlenienia jest dość stabilny, podczas gdy Mn(III) już tak stabilny nie jest.[91] W roślinach zdecydowanie dominującą formą jest mangan na II stopniu utlenienia, ponieważ jest dostępny do pobrania przez rośliny.[172] Dwuwartościowa forma manganu może być łatwo utleniona do Mn(III) i Mn(IV), lecz nie jest to korzystne, ze względu na słabą stabilność trójwartościowej formy oraz skłonność Mn(IV) do tworzenia wysoce nierozpuszczalnych tlenów i osadów.[173] W roślinach mangan jest jednym z 17 pierwiastków niezbędnych do wzrostu i reprodukcji. Jest on potrzebny roślinom tylko w niewielkich ilościach, ale ostatecznie jest tak samo ważny dla wzrostu, jak inne składniki odżywcze.[174] Niedobór Mn może być poważnym zaburzeniem odżywiania roślin. Zaburzenia te mogą zwłaszcza występować w glebach o wysokim pH i wysokim ciśnieniu parcjalnym tlenu, gdzie biodostępność manganu może spaść znacznie poniżej poziomu wymaganego do normalnego wzrostu roślin.[91]

3.4.1. Znaczenie manganu w roślinach

Mangan bierze udział w wielu funkcjach biochemicznych, głównie jako aktywator enzymów, takich jak dehydrogenazy, transferazy, hydroksylazy i dekarboksylazy biorących udział w oddychaniu, syntezie aminokwasów i ligniny oraz regulacji stężenia hormonów.[175] Wiadomo, że Mn^{2+} jest specyficznym składnikiem dwóch enzymów: arginazy i fosfotransferazy, ale ze względu na zdolność do zastępowania Mg w enzymach

aktywuje też wiele innych. Mechanizm, za pomocą którego Mn^{2+} aktywuje kilka oksydaz, nie jest jeszcze dokładnie poznany, ale wydaje się, że jest związany ze zmianą wartościowości między Mn^{3+} i Mn^{2+} . [92] Mangan bierze również udział w fotosyntetycznej ewolucji tlenu w chloroplastach (reakcja Hilla). Ze względu na kluczową rolę Mn w tym zasadniczym procesie, w momencie nawet umiarkowanych niedoborów tego pierwiastka, następuje zahamowanie fotosyntezy. Nie wpływa natomiast na strukturę chloroplastu ani nie powoduje jego rozpadu, aż do osiągnięcia poważnego niedoboru. [176]

3.4.2. Udział manganu w reakcjach redoks

Mangan bierze udział w reakcjach utleniania-redukcji (redoks) w fotosyntetycznym systemie transportu elektronów w roślinach. [177] W książce „Trace elements in soils and plants” zaproponowano następujące reakcje redoks dla manganu występujące w środowisku: [92]

- a) Redukcja $Mn^{3+} \rightarrow Mn^{2+}$, abiotyczna i biotyczna, przez: pierwiastki i substancje takie jak: Fe^{2+} , Cr^{3+} , S, fenole, związki organiczne (substancje humusowe) oraz bakterie redukujące
- b) Utlenianie $Mn^{2+} \rightarrow Mn^{3+}$, Mn^{4+} , mogące zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, wynikające z reakcji biologicznych lub autokatalitycznych
- c) W momencie utworzenia się Mn^{3+} , który jest niezwykle reaktywną formą, następuje szybkie przyjęcie lub oddanie elektronu i przekształcenie się Mn^{3+} do odpowiedniej formy
- d) W momencie utworzenia się Mn^{2+} , ten jest albo adsorbowany przez MnO_2 , albo utleniany do Mn^{3+} lub Mn^{4+}
- e) W obieg redoks manganu są również zaangażowane ligandy organiczne i fosforanowe

3.4.3. Mangan w glebach w zależności od pH

Chociaż Mn występuje obficie w większości gleb, to szczególne warunki pH gleby i warunki redoks mogą mieć duży wpływ na stężenie Mn^{2+} w glebach. Wysokie pH zmniejsza dostępność manganu poprzez tworzenie MnO_2 , podczas gdy redukcja tlenu w powietrzu glebowym, poprzez zagęszczenie gleby lub zalanie jej, zwiększa stężenie Mn^{2+} . [178] pH gleby wpływa na zmianę mobilności manganu z gleby do powierzchni

korzeni, co skutkuje różnicą w możliwościach wchłaniania tego pierwiastka.[147,179] Niedobór manganu najczęściej występuje w glebach wapiennych, których pH waha się od 7,3 do 8,5. Gleby, które mają wysoką zawartość substancji organicznych, niską gęstość nasypową i niskie stężenie łatwo redukowalnego manganu w glebie, są również podatne na niedobory manganu. W klimacie chłodnym i umiarkowanym najczęściej obserwuje się niski poziom manganu, chociaż pojawiły się także doniesienia o niskich zawartościach tego pierwiastka w obszarach tropikalnych i suchych.[147] Dwuwartościowy mangan jest formą wchłanianą na błonie komórkowej powierzchni korzenia. Wraz ze spadkiem pH gleby, udział wymiennego Mn^{2+} znacznie wzrasta.[180] Zakwaszanie gleby może również hamować utlenianie mikrobiologiczne, które jest odpowiedzialne za unieruchamianie manganu. Mikroby utleniające mangan to najskuteczniejszy biologiczny system utleniający Mn^{2+} w glebach obojętnych i lekko zasadowych.[181] Przy pH powyżej 8,5-9 zachodzi autoutlenianie manganu.[182]

3.4.4. Transport i przyswajanie manganu w roślinach

Jak wspomniano wcześniej, mangan jest preferencyjnie pobierany przez rośliny jako wolny jon Mn^{2+} z roztworu glebowego. Łatwo kompleksuje się z roślinnymi i drobnoustrojowymi ligandami organicznymi oraz z syntetycznymi chelatami. Jednak ogólnie uważa się, że kompleksy utworzone z syntetycznymi chelatami są wchłaniane przez korzenie wolniej, niż wolny kation.[183] Wchłanianie manganu przez korzenie charakteryzuje się dwufazowym wchłanianiem. Pierwsza faza wychwytu jest szybka, odwracalna i niemetaliczna. Jony takie jak Mn^{2+} czy Ca^{2+} są wymieniane swobodnie. W tej początkowej fazie, mangan wydaje się być adsorbowany przez składniki ściany komórkowej przestrzeni apoplastycznej komórek korzenia.[184] Druga faza jest wolniejsza, mangan jest słabiej wymieniany, a jego przyswajanie zależy od metabolizmu. Podczas tej wolniejszej fazy, mangan jest wchłaniany przez tzw. symplast.[185] Mangan łatwo przemieszcza się od korzenia do pędu w transpiracyjnym strumieniu soku ksylemowego.[186] Natomiast, mimo łatwego transportu manganu z korzenia do pędu, ponowna transllokacja w obrębie łyka jest złożona. W dodatku mangan w liściach pozostaje nieruchomy,[187–189] ale może zostać ponownie zmobilizowany z korzeni i łądyg.[190]

3.4.5. Skutki niedoborów manganu w roślinach

Krytyczne wartości niedoborów Mn dla większości roślin wahają się od 15 do 25 mg/kg.[92] Ze względu na opisaną powyżej immobilizację manganu w liściach, skutki niedoborów nie objawiają się na starych liściach rośliny. Objawy niedoborów obserwuje

się na w pełni rozwiniętych młodych liściach, lecz nie na najnowszym liście.[147] Przepisanie konkretnych cech do symptomów deficytu manganu nie jest proste. Charakterystyczne objawy niedoboru manganu stają się jednoznaczne dopiero przy znacznym ograniczeniu tempa wzrostu rośliny.[190] Można wtedy zaobserwować rozlaną chlorozę międzynerwową na młodych, rozszerzonych blaszkach liściowych.[191] Pozwala to odróżnić objawy chlorozy wynikającej z niedoboru żelaza, która charakteryzuje się siecią zielonych żył.[190] W przeciwieństwie do chlorozy z niedoboru żelaza, chloroza wywołana niedoborem manganu nie jest równomiernie rozłożona na całej blaszce liściowej (Rys. 23), przez co tkanka może szybko ulec nekrozie.[116]



Rys. 23 Objawy niedoborów manganu w postaci mozaikowej chlorozy (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[192]

Nekroza objawia się czerwonymi i brązowymi plamami na liściach oraz brązowieniem korzeni.[92] Brak zdolności do relokacji manganu ze starych liści do młodszych oznacza, że najbardziej przydatne do dalszej analizy chemicznej, w celu potwierdzenia niedoboru manganu są najmłodsze liście.[147] Najbardziej wrażliwym ze wszystkich składników komórki rośliny są chloroplasty, reagując na niedobór Mn poprzez wykazywanie zaburzeń strukturalnych.[92]

Wykaz rysunków

Rys. 1	Struktura kwasu etylenodiaminotetraoctowego.....	12
Rys. 2	Schemat syntezy soli sodowej EDTA zaproponowanej przez Munza[29].....	12
Rys. 3	Schemat syntezy soli sodowej EDTA zaproponowanej przez Berswortha[30]	13
Rys. 4	Schemat syntezy soli sodowej EDTA opatentowanej przez Krolla i Dextera[31].	13
Rys. 5	Schemat dwuetapowej syntezy otrzymywania soli sodowej EDTA zaproponowanej przez Singera i Weisberga[32].....	13
Rys. 6	Struktura kwasu dietylenotriaminopenta octowego.....	14
Rys. 7	Schemat syntezy otrzymywania soli sodowej DTPA opisany w chińskim patencie CN103570571B[41].....	15
Rys. 8	Trzyetapowy schemat syntezy otrzymywania DTPA opisany w chińskim zgłoszeniu patentowym CN102875400A[42].....	15
Rys. 9	Struktury trzech izomerów EDDHA	17
Rys. 10	Mechanizm Mannicha	18
Rys. 11	Struktury trzech izomerów HBED.....	20
Rys. 12	Schemat otrzymywania szkieletu HBED na drodze redukcyjnego aminowania (u góry) i reakcji Mannicha (na dole).....	21
Rys. 13	Struktura kwasu iminodibursztynowego	22
Rys. 14	Schemat syntezy otrzymywania soli sodowej IDS opisany w patencie firmy Bayer[71]	23
Rys. 15	Struktury trzech stereoizomerów IDS	23
Rys. 16	Struktura kwasu etylenodiamino-N,N'-dibursztynowego	24
Rys. 17	Ogólny schemat budowy liścia (grafikę wykorzystano na zasadach creative commons)[89].....	26
Rys. 18	Ogólny schemat budowy rośliny (grafikę wykorzystano na zasadach creative commons)[90].....	26
Rys. 19	Struktura hemu typu b, będąca przykładem cytochomu p450[104].....	29
Rys. 20	Chloroza międzyżyłkowa będąca objawem niedoboru żelaza (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[110].....	31
Rys. 21	Objawy niedoborów cynku na liściach herbaty, widoczne na młodych liściach (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[140]	35
Rys. 22	Nekroza na liściach brokuła, będąca wynikiem niedoboru miedzi (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[166]	39

Rys. 23 Objawy niedoborów manganu w postaci mozaikowej chlorozy (obraz wykorzystany w pracy na zasadach licencji Creative Commons)[192]43

Wykaz tabel

Tabela 1 Elementy strukturalne i ich współczynniki biodegradowalności. Na podstawie publikacji:[12].....9

Bibliografia

- [1] J.W. Raymond, T.N. Rogers, D.R. Shonnard, A.A. Kline, A review of structure-based biodegradation estimation methods, *J. Hazard. Mater.*, 84, **2001**, 189–215, DOI:10.1016/S0304-3894(01)00207-2
- [2] K.M. Scow, Rate of biodegradation, *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*, W.J. Lyman, W.F. Reehl, W.F. Rosenblatt (red.), New York, McGraw-Hill, **1983**
- [3] T.P. Baczynski, D. Pleissner, T. Grotenhuis, Anaerobic biodegradation of organochlorine pesticides in contaminated soil - Significance of temperature and availability, *Chemosphere*, 78, **2010**, 22–28, DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.09.058
- [4] M. Fernandes, A. Salvador, M.M. Alves, A.A. Vicente, Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil, *Polym. Degrad. Stab.*, 182, **2020**, 109408, DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109408
- [5] N.G. Ternan, J.W. Mc Grath, G. Mc Mullan, J.P. Quinn, Review: Organophosphonates: Occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14, **1998**, 635–647, DOI:10.1023/A:1008848401799
- [6] S.F. Pesce, D.A. Wunderlin, Biodegradation of 2,4- and 2,6-diaminotoluene by acclimated bacteria, *Water Res.*, 31, **1997**, 1601–1608, DOI:10.1016/S0043-1354(96)00403-4
- [7] M. Kowalska, M. Bodzek, J. Bohdziewicz, Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms, *Process Biochem.*, 33, **1998**, 189–197, DOI:10.1016/S0032-9592(97)00103-9
- [8] L. Ström, A.G. Owen, D.L. Godbold, D.L. Jones, Organic acid behaviour in a calcareous soil: Sorption reactions and biodegradation rates, *Soil Biol. Biochem.*, 33, **2001**, 2125–2133, DOI:10.1016/S0038-0717(01)00146-8
- [9] Y. Yao, R. Shen, K.G. Pennel, E.M. Suuberg, A numerical investigation of oxygen concentration dependence on biodegradation rate laws in vapor intrusion, *Environ. Sci. Process. Impacts*, 15, **2013**, 2345–2354, DOI:10.1039/c3em00421j

- [10] B. Nörtemann, Biodegradation of Chelating Agents: EDTA, DTPA, PDTA, NTA, and EDDS, **2005**, 150–170, DOI:10.1021/bk-2005-0910.ch008
- [11] B. Tokés, J. Száva, S. Duşa, A. Vintilă, G. Donáth-Nagy, G. Gál, Soft ligands - Biodegradable complexants in plant cultivation and environmental protection, *Pharmazie*, 61, **2006**, 166–170,
- [12] B. Tokés, J. Száva, S. Duşa, L. Ferencz, A. Vintilă, G. Donáth-Nagy, The importance, design and modeling of biodegradable complexants. An extension of the structure-soft character relations, *Pharmazie*, 63, **2008**, 185–193, DOI:10.1691/ph.2008.7772
- [13] F.G. Kari, W. Giger, Modeling the Photochemical Degradation of Ethylenediaminetetraacetate in the River Glatt, *Environ. Sci. Technol.*, 29, **1995**, 2814–2827, DOI:10.1021/es00011a018
- [14] F.G. Kari, S. Huger, S. Canonica, Determination of the Reaction Quantum Yield for the Photochemical Degradation of Fe(III)-EDTA: Implications for the Environmental Fate of EDTA in Surface Waters, *Environ. Sci. Technol.*, 29, **1995**, 1008–1017, DOI:10.1021/es00004a022
- [15] I.S.S. Pinto, I.F.F. Neto, H.M.V.M. Soares, Biodegradable chelating agents for industrial, domestic, and agricultural applications—a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, **2014**, 11893–11906, DOI:10.1007/s11356-014-2592-6
- [16] P. Pitter, V. Sýkora, Biodegradability of ethylenediamine-based complexing agents and related compounds, *Chemosphere*, 44, **2001**, 823–826, DOI:10.1016/S0045-6535(00)00512-9
- [17] Introduction to the OECD guidelines for testing of chemicals section 3, **2003**
- [18] OECD Guideline for testing of chemicals: 301B CO2 Evolution Test, **1992**
- [19] OECD Guideline for Testing of Chemicals: 302A Inherent Biodegradability: Modified SCAS Test, **1981**
- [20] M. Huculak, M. Borowiec, J. Skut, K. Hoffmann, J. Hoffmann, Badanie tlenowej biodegradacji związków chelatujących mikroelementy nawozowe w środowisku wodnym w warunkach testu statycznego, *Proc. ECOpole*, 3, **2009**, 465–470,

- [21] M. Borowiec, P. Polańska, Biodegradability of the compounds introduced with microelement fertilizers into the environment, *Polish J. Chem. Technol.*, 9, **2007**, 38–41, DOI:10.2478/v10026-007-0050-7
- [22] M. Borowiec, M. Huculak, K. Hoffmann, J. Hoffmann, Biodegradation of selected substances used in liquid fertilizers as an element of Life Cycle Assessment, *Polish J. Chem. Technol.*, 11, **2009**, 1–3, DOI:10.2478/v10026-009-0001-6
- [23] E. Klem-marciniak, D. Popławski, M. Porwoł, J. Pająk, K. Hoffmann, Breeding of the activated sludge to use for studies on biodegradation of fertilizer chelates, 11, **2017**, 5–8, DOI:10.2429/proc.2017.11(1)018
- [24] Polska Norma: PN-C-05561:1988. Badanie tlenowej biodegradacji związków organicznych w środowisku wodnym w warunkach testu statycznego, **1988**
- [25] Polska Norma PN-72 C-04550. Badania zawartości syntetycznych substancji powierzchniowo czynnych oraz ich biochemicznego utleniania, **1973**
- [26] Polska Norma: PN-C-04646:2001. Badanie biodegradacji „częściowej” anionowych i niejonowych substancji powierzchniowo czynnych. Test potwierdzający metodą osadu czynnego, **2001**
- [27] M. Bucheli-Witschel, T. Egli, Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids, *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, **2001**, 69–106, DOI:10.1016/S0168-6445(00)00055-3
- [28] M.E.T. Sillanpää, T.A. Kurniawan, W. Lo, Degradation of chelating agents in aqueous solution using advanced oxidation process (AOP), *Chemosphere*, 83, **2011**, 1443–1460, DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.01.007
- [29] F. Munz, Polyamino carboxylic acids and process of making same, US2130505, **1936**
- [30] F. Bersworth, Method of forming carboxylic amino acids, US2387735, **1945**
- [31] H. Kroll, M. Dexter, Process for the manufacture of tetrasodium ethylenediamine tetraacetate, US2845457, **1958**
- [32] J.J. Singer, M. Weisberg, Process and preparation of amino nitriles and acetic acids, US3061628, **1962**

- [33] M.E.T. Sillanpää, T.A. Kurniawan, W. hung Lo, Degradation of chelating agents in aqueous solution using advanced oxidation process (AOP), *Chemosphere*, 83, **2011**, 1443–1460, DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.01.007
- [34] M. Sillanpää, Complexing agents in waste water effluents of six Finnish pulp and paper mills, *Chemosphere*, 33, **1996**, 293–302, DOI:10.1016/0045-6535(96)00172-5
- [35] B. Nörtemann, Biodegradation of EDTA, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, **1999**, 751–759, DOI:10.1007/s002530051458
- [36] J.M. Tiedje, Microbial Degradation of Ethylenediaminetetraacetate in Soils and Sediments, *Appl. Microbiol.*, 30, **1975**, 327–329, DOI:10.1128/am.30.2.327-329.1975
- [37] R.T. Belly, J.J. Lauff, C.T. Goodhue, Degradation of Ethylenediaminetetraacetic Acid by Microbial Populations from an Aerated Lagoon, *Appl. Microbiol.*, 29, **1975**, 787–794, DOI:10.1128/am.29.6.787-794.1975
- [38] M.S. Diallo, L. Balogh, A. Shafagati, J. Johnson, W.A. Goddard, D.A. Tomalia, Poly(amidoamine) Dendrimers: A New Class of High Capacity Chelating Agents for Cu(II) Ions, *Environ. Sci. Technol.*, 33, **1999**, 820–824, DOI:10.1021/es980521a
- [39] J. Rämö, M. Sillanpää, Degradation of EDTA by hydrogen peroxide in alkaline conditions, *J. Clean. Prod.*, 9, **2001**, 191–195, DOI:10.1016/S0959-6526(00)00049-4
- [40] C.G. van Ginkel, R. Geerts, Full-Scale Biological Treatment of Industrial Effluents Containing EDTA, *Biogeochemistry of Chelating Agents*, B. Nowack, V. Jeanne M. (red.), Washington, American Chemical Society, **2005**
- [41] F. Ai, Q. Ai, Q. Chen, J. Huang, Synthesis method of DTPA (diethylene triamine pentacetic acid) penta-sodium salt, CN103570571B, **2014**
- [42] X. Cong, Z. Xie, F. Zhu, Y. Dong, Y. Xin, Diethylenetriamine pentaacetic acid preparation method, CN102875400B, **2014**
- [43] B.C.. Larisch, S.J. Duff, Effect of DTPA and EDTA on activated sludge reactors treating bleached kraft mill effluent, *Tappi J.*, 83, **2000**

- [44] S. Metsärinne, P. Rantanen, R. Aksela, T. Tuhkanen, Biological and photochemical degradation rates of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in the presence and absence of Fe(III), *Chemosphere*, 55, **2004**, 379–388, DOI:10.1016/j.chemosphere.2003.10.062
- [45] D. Mckenzie, J.-J. Lucena, D.A. Jackson, Plant nutrient based on o,p-ethylene(bis)hydroxyphenyl glycines, WO2005/095305 A1, **2005**
- [46] H. Kroll, M. Knell, J. Powers, J. Simonian, A phenolic analog of ethylenediamine tetraacetic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, **1957**, 2024–2025, DOI:10.1021/ja01565a075
- [47] M. Knell, H. Kroll, Iron chelates of ethylene bis(alpha-imino-ortho-hydroxyphenylacetic acid) and method of overcoming iron deficiencies in growing plants therewith, US2921847, **1960**
- [48] A.E. Frost, H.H. Freedman, Addition of Hydrogen Cyanide to Aromatic Schiff Bases, *J. Org. Chem.*, 24, **1959**, 1905–1907, DOI:10.1021/jo01094a021
- [49] M.A. Sierra Rodriguez, M. Gomez Gallego, R. Alcazar Montero, J.J. Lucena Marotta, A. Alvarez Fernandez, F. Yunta Mezquita, Novel method for preparing bis(2-hydroxyaryl)aminoacetic acids using cyanide transfer agents, WO02/00604A1, **2002**
- [50] M. Dexter, Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids, US2824128, **1958**
- [51] P. Apicella, S. Cascone, F. De Santis, G. Lamberti, Iron Chelates: Production Processes and Reaction Evolution Analysis, *Chem. Eng. Commun.*, 203, **2016**, 861–869, DOI:10.1080/00986445.2015.1114476
- [52] N. Kornblum, R. Seltzer, P. Haberfield, Solvation as a Factor in the Alkylation of Ambident Anions: The Importance of the Dielectric Factor, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, **1963**, 1148–1154, DOI:10.1021/ja00891a025
- [53] N. Kornblum, A.P. Lurie, Heterogeneity as a Factor in the Alkylation of Ambident Anions: Phenoxide Ions, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, **1959**, 2705–2715, DOI:10.1021/ja01520a030
- [54] N. Kornblum, P.J. Berrigan, W.J. Le Noble, Solvation as a Factor in the Alkylation

- of Ambident Anions: The Importance of the Hydrogen Bonding Capacity of the Solvent, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, **1963**, 1141–1147, DOI:10.1021/ja00891a024
- [55] H.E. Petree, J.W. Stutts, Treatment of iron deficiencies in plants with iron complexes of ethylene-bis-(α -imino-2-hydroxyaryl acetic acid), US3981712, **1976**
- [56] H.E. Petree, J.W. Stutts, Iron complexes of ethylene-bis-(α -2-hydroxyaryl acetic acid), US3903119, **1975**
- [57] H.E. Petree, H.L. Myatt, A.M. Jelenevsky, Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids, US413582, **1978**
- [58] E. Klem-Marciniak, K. Hoffmann, J. Hoffmann, The Aerobic biodegradation of EDDHA and EDDHSA in water under the static test conditions, *Desalin. Water Treat.*, 134, **2018**, 1–6, DOI:10.5004/dwt.2018.22280
- [59] L. Hernández-Apaolaza, J.J. Lucena, Influence of irradiation time and solution concentration on the photochemical degradation of EDDHA/Fe 3+ : effect of its photodecomposition products on soybean growth, *J. Sci. Food Agric.*, 91, **2011**, 2024–2030, DOI:10.1002/jsfa.4414
- [60] R. Ma, R.J. Motekaitis, A.E. Martell, Stability of metal ion complexes of N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid, *Inorganica Chim. Acta*, 224, **1994**, 151–155, DOI:10.1016/0020-1693(94)04012-5
- [61] F. L'Eplattenier, I. Murase, A.E. Martell, New Multidentate Ligands. VI. Chelating Tendencies of N,N'-Di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, **1967**, 837–843, DOI:10.1021/ja00980a019
- [62] H. Kroll, J. V. Simonian, M. Knell, Treating iron deficient plants with ferric chelates of ethylenediaminediacetic acids containing phenolic groups, US3038793, **1962**
- [63] H. Kroll, J. V. Simonian, M. Knell, Ethylenediaminediacetic acids containing phenolic groups, US2967196, **1961**
- [64] A.M. Reichwein, H.J. Jongen, M. Groote, Process to prepare phenolic ethylenediamine diacetic acid compounds, WO2016/207266 A1, **2016**
- [65] J.M. Mckearin, Method for making HBED, WO01/46114A1, **2001**
- [66] A. Nawrocki, R. Olszewski, F. Stefaniak, A. Mrozek-Niećko, A process for the

- preparation of N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid and its derivatives, EP2039679A1, **2009**
- [67] A. Nawrocki, R. Olszewski, K.K. Ciarka, B.T. Michalek, E. Stegient-nowicka, M. Matyniak, T. Wilk, J. Pernak, A process for the preparation of salts of N,N'-disubstituted ethylenediamine-N,N'-diacetic acid derivatives and their use, EP 3848349 A1, **2021**
- [68] HBED-Fe - Biodegradation. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/30778/5/1>, dostęp dnia: 06/14/2022
- [69] J. Wu, F.C. Hsu, S.D. Cunningham, Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation constraints, *Environ. Sci. Technol.*, **33**, **1999**, 1898–1904, DOI:10.1021/es9809253
- [70] Pfizer INC, A process for preparing iminodisuccinic acid, GB1306331, **1973**
- [71] T. Groth, W. Joentgen, P. Wagner, F. Doebert, E. Wenderoth, T. Roick, Preparation and use of iminodisuccinic acid salts, EP0975582B1, **2002**
- [72] A. Mitschker, R.-J. Moritz, A. Nawrocki, Process for obtaining plant micronutrients, EP1411037B1, **2011**
- [73] D. Kołodyska, D. Kołodyska, Chelating Agents of a New Generation as an Alternative to Conventional Chelators for Heavy Metal Ions Removal from Different Waste Waters, *Expanding Issues in Desalination*, R.Y. Ning (red.), Rijeka, InTech, **2011**
- [74] H. Hyvönen, M. Orama, H. Saarinen, R. Aksela, Studies on biodegradable chelating ligands: Complexation of iminodisuccinic acid (ISA) with Cu(II), Zn(II), Mn(II) and Fe(III) ions in aqueous solution, *Green Chem.*, **5**, **2003**, 410–414, DOI:10.1039/b303372b
- [75] D. Kołodyska, Application of a new generation of complexing agents in removal of heavy metal ions from different wastes, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **20**, **2013**, 5939–5949, DOI:10.1007/s11356-013-1576-2
- [76] D. Schowanek, T.C.J. Feijtel, C.M. Perkins, F.A. Hartman, T.W. Federle, R.J. Larson, Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), a transition metal chelator, *Chemosphere*, **34**, **1997**, 2375–

- 2391, DOI:10.1016/S0045-6535(97)00082-9
- [77] R. Takahashi, N. Fujimoto, M. Suzuki, T. Endo, Biodegradabilities of ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid (EDDS) and other chelating agents, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, **1997**, 1957–1959, DOI:10.1271/bbb.61.1957
- [78] C. Kezerian, W.M. Ramsey, Bis-adduction products and methods of preparing same, US3158635, **1964**
- [79] F. Pavelcik, J. Majer, New complexanes. XXXIV. Preparation and properties of the meso and rac forms of ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid, *Chem. Zvesti*, 32, **1978**, 37–41,
- [80] J. Majer, V. Springer, B. Kopecká, Nové komplexany (VIII) Kyselina etyléndiamín-N,N'-dijantárová a spektrofotometrické štúdium jej komplexov s ťažkými kovmi, *J Chem. Zvesti*, 20, **1966**, 414–422,
- [81] N. Zwicker, U. Theobald, H. Zähler, H.P. Fiedler, Optimization of fermentation conditions for the production of ethylene-diamine-disuccinic acid by *Amycolatopsis orientalis*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 19, **1997**, 280–285, DOI:10.1038/sj.jim.2900458
- [82] T. Nishikiori, A. Okuyama, H. Naganawa, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi, T. Aoyagi, H. Umezawa, Production by actinomycetes of (S,S)-N,N'-ethylenediaminedisuccinic acid, an inhibitor of phospholipase C., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 37, **1984**, 426–427, DOI:10.7164/antibiotics.37.426
- [83] I.S.S. Pinto, I.F.F. Neto, H.M.V.M. Soares, Biodegradable chelating agents for industrial, domestic, and agricultural applications—a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, **2014**, 11893–11906, DOI:10.1007/s11356-014-2592-6
- [84] J.F. von Liebig, Die chemie in ihrer anwendung auf agricultur und physiologie, Braunschweig, Fiedr. Vieweg und Sohn, **1876**
- [85] J. von Liebig, Die organische Chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie, Braunschweig, Fiedr. Vieweg und Sohn, **1841**
- [86] J.F. von Liebig, Die grundsätze der agricultur-chemie mit rücksicht auf die in england angestellten untersuchungen, Braunschweig, Fiedr. Vieweg und Sohn, **1855**

- [87] K. Mengel, E.A. Kirkby, H. Kosegarten, T. Appel, Plant Nutrients, *Principles of Plant Nutrition*, K. Mengel, E.A. Kirkby (red.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, **2001**
- [88] Z. Starck, Rola składników mineralnych w roślinie, *Fizjologia Roślin*, J. Kopcewicz, S. Lewak (red.), Warszawa, PWN, **2002**
- [89] Leaf anatomy. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leaf_anatomy.svg, dostęp dnia: 08/01/2022
- [90] Plant Anatomy. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plant_Anatomy.svg, dostęp dnia: 08/01/2022
- [91] P. Marschner, Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, San Diego, Elsevier Ltd, **2012**
- [92] A. Kabata-Pendias, Trace elements in soils and plants, Boca Raton, Taylor & Francis, **2011**
- [93] R.M. Cornell, U. Schwertmann, The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses, New York, VCH Weinheim, **2003**
- [94] J.F. Ma, H.Q. Ling, Iron for plants and humans, *Plant Soil*, 325, **2009**, 1–3, DOI:10.1007/s11104-009-0203-y
- [95] T. Kobayashi, N.K. Nishizawa, Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 63, **2012**, 131–152, DOI:10.1146/annurev-arplant-042811-105522
- [96] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection, *Trends Biochem. Sci.*, 11, **1986**, 372–375, DOI:10.1016/0968-0004(86)90207-0
- [97] B. Halliwell, The wanderings of a free radical, *Free Radic. Biol. Med.*, 46, **2009**, 531–542, DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008
- [98] H.J.H. Fenton, LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc., Trans.*, 65, **1894**, 899–910, DOI:10.1039/CT8946500899
- [99] W.H. Koppenol, The centennial of the Fenton reaction, *Free Radic. Biol. Med.*, 15, **1993**, 645–651, DOI:10.1016/0891-5849(93)90168-T

- [100] F. Haber, J. Weiss, Über die Katalyse des Hydroperoxydes, *Naturwissenschaften*, 20, **1932**, 948–950, DOI:10.1007/BF01504715
- [101] F. Haber, R. Willstätter, Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge, *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)*, 64, **1931**, 2844–2856, DOI:10.1002/cber.19310641118
- [102] J. Weiss, Reaction mechanism of the enzymes catalase and peroxidase in the light of the theory of chain reactions, *J. Phys. Chem.*, 41, **1937**, 1107–1116, DOI:10.1021/j150386a008
- [103] W.H. Koppenol, The Haber-Weiss cycle - 70 years later, *Redox Rep.*, 6, **2001**, 229–234, DOI:10.1179/135100001101536373
- [104] D.J. Cook, J.D. Finnigan, K. Cook, G.W. Black, S.J. Charnock, Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Z.C. Christo (red.), Cambridge, Elsevier Inc., **2016**
- [105] P. Lemanceausoils, P. Bauer, S. Kraemer, J.F. Briat, Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes, *Plant Soil*, 321, **2009**, 513–535, DOI:10.1007/s11104-009-0039-5
- [106] V. Romheld, Different strategies for iron acquisition in higher plants, *Physiol. Plant.*, 70, **1987**, 231–234, DOI:10.1111/j.1399-3054.1987.tb06137.x
- [107] J.F. Ma, Plant Root Responses to Three Abundant Soil Minerals: Silicon, Aluminum and Iron, *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, 24, **2005**, 267–281, DOI:10.1080/07352680500196017
- [108] C. Curie, J.F. Briat, Iron Transport and Signaling in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, **2003**, 183–206, DOI:10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018
- [109] I. Stewart, C.D. Leonard, Chelates as Sources of Iron for Plants Growing in the Field, *Science (80-.)*, 116, **1952**, 564–566, DOI:10.1126/science.116.3021.564
- [110] Interveinal chlorosis at apical meristem. <https://flic.kr/p/pvtxeo>, dostęp dnia: 07/28/2022
- [111] J. Abadía, F. Morales, A. Abadía, Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-

- deficient leaves, *Plant Soil*, 215, **1999**, 183–192, DOI:10.1023/A:1004451728237
- [112] A.R. Arulanantham, I.M. Rao, N. Terry, Limiting Factors in Photosynthesis, *Plant Physiol.*, 93, **1990**, 1466–1475, DOI:10.1104/pp.93.4.1466
- [113] A.L. Sommer, C.B. Lipman, Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants, *Plant Physiol.*, 1, **1926**, 231–249, DOI:10.1104/pp.1.3.231
- [114] B.J. Alloway, Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans, *Environ. Geochem. Health*, 31, **2009**, 537–548, DOI:10.1007/s10653-009-9255-4
- [115] A. Kabata-Pendias, W. Sadurski, Trace Elements and Compounds in Soil, *Elements and Their Compounds in the Environment*, M. Merian, M. Anke, M. Ihnat, M. Stoepler (red.), Weinheim, Wiley-VCH, **2004** DOI:10.1002/9783527619634.ch5
- [116] V. Romheld, H. Marschner, Function of micronutrients in plants, *Micronutr. Agric.*, **2018**, 297–228, DOI:10.2136/sssabookser4.2ed.c9
- [117] J.F. Pedler, T.B. Kinraide, D.R. Parker, Zinc rhizotoxicity in wheat and radish is alleviated by micromolar levels of magnesium and potassium in solution culture, *Plant Soil*, 259, **2004**, 191–199, DOI:10.1023/B:PLSO.0000020958.42158.f5
- [118] S.R. Mousavi, M. Galavi, M. Rezaei, The interaction of zinc with other elements in plants : A review . The interaction of zinc with other elements in plants : a review, *Int. J. Agric. Crop Sci.*, 4, **2012**, 1881–1884,
- [119] I. Cakmak, Tansley review no. 111: Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species, *New Phytol.*, 146, **2000**, 185–205, DOI:10.1046/j.1469-8137.2000.00630.x
- [120] B.L. Vallee, D.S. Auld, Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins, *Biochemistry*, 29, **1990**, 5647–5659, DOI:10.1021/bi00476a001
- [121] B.L. Vallee, K.H. Falchuk, The biochemical basis of zinc physiology, *Physiol. Rev.*, 73, **1993**, 79–118, DOI:10.1152/physrev.1993.73.1.79
- [122] B.J. Alloway, Zinc in soils and crop production, Paris, International Fertilizer Industry Association, **2008**
- [123] T. Tsonev, F.J.C. Lidon, Zinc in plants - An overview, *Emirates J. Food Agric.*, 24, **2012**, 322–333,

- [124] K. Mengel, E.A. Kirkby, Zinc, *Principles of Plant Nutrition*, K. Mengel, E.A. Kirkby (red.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, **2001**
- [125] W.L. Lindsay, Zinc in Soils and Plant Nutrition, *Advances in Agronomy*, N.C. Brady (red.), New York, Academic Press, **1972**
- [126] F.K. Zengin, The effects of Ni²⁺ and Cr³⁺ on the contents of chlorophyll, protein, abscisic acid and proline in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) seedlings, *J. Environ. Biol.*, *27*, **2006**, 441–448,
- [127] R. Hajiboland, H. Amirazad, Drought tolerance in Zn-deficient red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra) plants, *Hortic. Sci.*, *37*, **2010**, 88–98, DOI:10.17221/64/2009-hortsci
- [128] M. Eslami, H. Dehghanzadeh, M. Jafarzade, R. Aminian, The effect of zinc on yield and yield components of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress., *Sci. J. Crop Sci.*, *3*, **2014**, 61–65, DOI:10.14196/sjcs.v3i6.1474
- [129] B.J. Alloway, Soil processes and the behaviour of metals, *Heavy Metals in Soils*, B.J. Alloway (red.), London, Blackie Academic and Professional, **1995**
- [130] B. Hafeez, Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review, *Am. J. Exp. Agric.*, *3*, **2013**, 374–391, DOI:10.9734/ajea/2013/2746
- [131] U.C. Shukla, S.B. Mittal, Characterization of Zinc Adsorption in Some Soils of India, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, *43*, **1979**, 905–908, DOI:10.2136/sssaj1979.03615995004300050017x
- [132] M. Saeed, R.L. Fox, Relations Between Suspension pH and Zinc Solubility in Acid and Calcareous Soils, *Soil Sci.*, *124*, **1977**, 199–204, DOI:10.1097/00010694-197710000-00002
- [133] F.G. Viets, A.S. Prasad, Zinc deficiency in the soil-plant system, *Zinc Metabolism*, A. Prasad (red.), Illinois, CC Thomas Springfield, **1966**
- [134] M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. Lux, Zinc in plants, *New Phytol.*, *173*, **2007**, 677–702, DOI:10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x
- [135] J.N. Pearson, Z. Rengel, C.F. Jenner, R.D. Graham, Transport of zinc and manganese to developing wheat grains, *Physiol. Plant.*, *95*, **1995**, 449–455,

DOI:10.1111/j.1399-3054.1995.tb00862.x

- [136] B.S. Haslett, R.J. Reid, Z. Rengel, Zinc mobility in wheat: Uptake and distribution of zinc applied to leaves or roots, *Ann. Bot.*, 87, **2001**, 379–386, DOI:10.1006/anbo.2000.1349
- [137] P.B. Tinker, Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants, *Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci.*, 294, **1981**, 41–55, DOI:10.1098/rstb.1981.0088
- [138] W.E. Schmid, H.P. Haag, E. Epstein, Absorption of Zinc by Excised Barley Roots, *Physiol. Plant.*, 18, **1965**, 860–869, DOI:10.1111/j.1399-3054.1965.tb06945.x
- [139] K.K.M. Nambiar, D.P. Motiramani, Tissue Fe/Zn ratio as a diagnostic tool for prediction of Zn deficiency in crop plants, *Plant Soil*, 60, **1981**, 357–367, DOI:10.1007/BF02149632
- [140] Zinc deficiency of tea. <https://flic.kr/p/ehaVhC>, dostęp dnia: 07/28/2022
- [141] H. Marschner, I. Cakmak, High Light Intensity Enhances Chlorosis and Necrosis in Leaves of Zinc, Potassium, and Magnesium Deficient Bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants, *J. Plant Physiol.*, 134, **1989**, 308–315, DOI:10.1016/S0176-1617(89)80248-2
- [142] K.D. Karlin, Z. Tyeklár, *Bioinorganic chemistry of copper*, London, Chapman & Hall, **2012**
- [143] C.B. Lipman, G. Mackinney, Proof of the Essential Nature of Copper for Higher Green Plants, *Plant Physiol.*, 6, **1931**, 593–599, DOI:10.1104/pp.6.3.593
- [144] A.L. Sommer, Copper as an essential for plant growth, *Plant Physiol.*, 6, **1931**, 339–345, DOI:10.1104/pp.6.2.339
- [145] Z. Shabbir, A. Sardar, A. Shabbir, G. Abbas, S. Shamshad, S. Khalid, Natasha, G. Murtaza, C. Dumat, M. Shahid, Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment, *Chemosphere*, 259, **2020**, 127436, DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.127436
- [146] R.A. Wuana, F.E. Okieimen, *Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation*, *ISRN*

- Ecol.*, 2011, **2011**, 1–20, DOI:10.5402/2011/402647
- [147] A. V. Barker, D.J. Pilbeam, Handbook of Plant Nutrition, Boca Raton, Taylor & Francis, **2007**
- [148] I. Yruela, Copper in plants: Acquisition, transport and interactions, *Funct. Plant Biol.*, 36, **2009**, 409–430, DOI:10.1071/FP08288
- [149] D.M. Marques, V. Veroneze Júnior, A.B. da Silva, J.R. Mantovani, P.C. Magalhães, T.C. de Souza, Copper Toxicity on Photosynthetic Responses and Root Morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae), *Water, Air, Soil Pollut.*, 229, **2018**, 138, DOI:10.1007/s11270-018-3769-2
- [150] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219, **1984**, 1–14, DOI:10.1042/bj2190001
- [151] F. Nazir, A. Hussain, Q. Fariduddin, Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress, *Chemosphere*, 230, **2019**, 544–558, DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.05.001
- [152] P. Ahmad, Plant metal interaction: emerging remediation techniques, Amsterdam, Elsevier, **2016**
- [153] G.R. Kovačič, M. Lešnik, S. Vršič, An overview of the copper situation and usage in viticulture, *Bulg. J. Agric. Sci.*, 19, **2013**, 50–59,
- [154] A.A. Ponizovsky, H.E. Allen, A.J. Ackerman, Copper activity in soil solutions of calcareous soils, *Environ. Pollut.*, 145, **2007**, 1–6, DOI:10.1016/j.envpol.2006.04.010
- [155] V. Römheld, The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach, *Plant Soil*, 130, **1991**, 127–134, DOI:10.1007/BF00011867
- [156] R. Carrillo-González, J. Šimůnek, S. Sauvé, D. Adriano, Mechanisms and Pathways of Trace Element Mobility in Soils, *Adv. Agron.*, 91, **2006**, 111–178, DOI:10.1016/S0065-2113(06)91003-7
- [157] S.M. Shaheen, J. Rinklebe, Geochemical fractions of chromium, copper, and zinc

- and their vertical distribution in floodplain soil profiles along the Central Elbe River, Germany, *Geoderma*, 228–229, **2014**, 142–159, DOI:10.1016/j.geoderma.2013.10.012
- [158] C.O. Ogunkunle, B. Bornmann, R. Wagner, P.O. Fatoba, R. Frahm, D. Lützenkirchen-Hecht, Copper uptake, tissue partitioning and biotransformation evidence by XANES in cowpea (*Vigna unguiculata* L) grown in soil amended with nano-sized copper particles, *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.*, 12, **2019**, 100231, DOI:10.1016/j.enmm.2019.100231
- [159] S. Sayen, C. Rocha, C. Silva, E. Vulliet, E. Guillon, C.M.R. Almeida, Enrofloxacin and copper plant uptake by *Phragmites australis* from a liquid digestate: Single versus combined application, *Sci. Total Environ.*, 664, **2019**, 188–202, DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.01.134
- [160] I.E. Zlobin, A. V. Kartashov, G. V. Shpakovski, Different roles of glutathione in copper and zinc chelation in *Brassica napus* roots, *Plant Physiol. Biochem.*, 118, **2017**, 333–341, DOI:10.1016/j.plaphy.2017.06.029
- [161] E.P. Colangelo, M. Lou Guerinot, Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, **2006**, 322–330, DOI:10.1016/j.pbi.2006.03.015
- [162] B. Irtelli, W.A. Petrucci, F. Navari-Izzo, Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess, *J. Exp. Bot.*, 60, **2009**, 269–277, DOI:10.1093/jxb/ern286
- [163] B.J. Alloway, A.R. Tills, Copper deficiency in world crops, *Outlook Agric.*, 13, **1984**, 32–42, DOI:10.1177/003072708401300105
- [164] J.F. Loneragan, R.D. Graham, A.D. Robson, Copper in soils and plants, Sydney, Academic Press, **1981**
- [165] S. Puig, N. Andrés-Colás, A. García-Molina, L. Peñarrubia, Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: Responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications, *Plant, Cell Environ.*, 30, **2007**, 271–290, DOI:10.1111/j.1365-3040.2007.01642.x

- [166] Brassica rapa-broccoli rabe leaf with copper deficiency. <https://flickr.com/photos/97499887@N06/24777617959>, dostep dnia: 07/28/2022
- [167] N. Jaime-Pérez, D. Kaftan, D. Bína, S.N.H. Bokhari, S. Shreedhar, H. Küpper, Mechanisms of sublethal copper toxicity damage to the photosynthetic apparatus of *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1860, **2019**, 640–650, DOI:10.1016/j.bbabi.2019.06.004
- [168] T. Ameh, C.M. Sayes, The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 71, **2019**, 103220, DOI:10.1016/j.etap.2019.103220
- [169] F. Lillo, R. Ginocchio, C. Ulriksen, E.A. Dovletyarova, A. Neaman, Evaluation of connected clonal growth of *Solidago chilensis* as an avoidance mechanism in copper-polluted soils, *Chemosphere*, 230, **2019**, 303–307, DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.04.199
- [170] D. Zhang, C. Li, Genotypic differences and glutathione metabolism response in wheat exposed to copper, *Environ. Exp. Bot.*, 157, **2019**, 250–259, DOI:10.1016/j.envexpbot.2018.06.032
- [171] J.S. McHargue, The Effect of Manganese on the Growth of Wheat: A Source of Manganese for Agricultural Purposes., *J. Ind. Eng. Chem.*, 11, **1919**, 332–335, DOI:10.1021/ie50112a022
- [172] H.R. Geering, J.F. Hodgson, C. Sdano, Micronutrient Cation Complexes in Soil Solution: IV. The Chemical State of Manganese in Soil Solution, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 33, **1969**, 81–85, DOI:10.2136/sssaj1969.03615995003300010023x
- [173] Schmidt, Husted, The Biochemical Properties of Manganese in Plants, *Plants*, 8, **2019**, 381, DOI:10.3390/plants8100381
- [174] S. Alejandro, S. Höller, B. Meier, E. Peiter, Manganese in Plants: From Acquisition to Subcellular Allocation, *Front. Plant Sci.*, 11, **2020**, 1–23, DOI:10.3389/fpls.2020.00300
- [175] R.D. Graham, Effects of Nutrient Stress on Susceptibility of Plants to Disease with Particular Reference to the Trace Elements, *Adv. Bot. Res.*, 10, **1983**, 221–276, DOI:10.1016/S0065-2296(08)60261-X

- [176] P.E. Kriedemann, R.D. Graham, J.T. Wiskich, Photosynthetic dysfunction and in vivo changes in chlorophyll a fluorescence from manganese-deficient wheat leaves, *Aust. J. Agric. Res.*, 36, **1985**, 157–169, DOI:10.1071/AR9850157
- [177] R.C. Prince, Manganese at the active site of the chloroplast oxygen-evolving complex, *Trends Biochem. Sci.*, 11, **1986**, 491–492, DOI:10.1016/0968-0004(86)90073-3
- [178] S.B. Schmidt, P.E. Jensen, S. Husted, Manganese Deficiency in Plants: The Impact on Photosystem II, *Trends Plant Sci.*, 21, **2016**, 622–632, DOI:10.1016/j.tplants.2016.03.001
- [179] H.G. Dion, P.J.G. Mann, Three-valent manganese in soils, *J. Agric. Sci.*, 36, **1946**, 239–245, DOI:10.1017/S0021859600023960
- [180] S.M. Bromfield, R.W. Cumming, D.J. David, C.H. Williams, Change in Soil Ph, Manganese and Aluminium Under Subterranean Clover Pasture, *Aust. J. Exp. Agric.*, 23, **1983**, 181–191, DOI:10.1071/EA9830181
- [181] N.C. Uren, G.W. Leeper, Microbial oxidation of divalent manganese, *Soil Biol. Biochem.*, 10, **1978**, 85–87, DOI:10.1016/0038-0717(78)90017-2
- [182] G.W. Leeper, Six trace elements in soils: Their Chemistry as Micro-nutrients, Melbourne, Melbourne University Press, **1970**
- [183] D.A. Barber, R.B. Lee, The effect of micro-organisms on the absorption of manganese by plants, *New Phytol.*, 73, **1974**, 97–106, DOI:10.1111/j.1469-8137.1974.tb04610.x
- [184] E.R. Page, J. Dainty, Manganese uptake by excised oat roots, *J. Exp. Bot.*, 15, **1964**, 428–443, DOI:10.1093/jxb/15.3.428
- [185] E. V. Maas, D.P. Moore, B.J. Mason, Manganese Absorption by Excised Barley Roots, *Plant Physiol.*, 43, **1968**, 527–530, DOI:10.1104/pp.43.4.527
- [186] S. Ramani, S. Kannan, Manganese Absorption and Transport in Rice, *Physiol. Plant.*, 33, **1975**, 133–137, DOI:10.1111/j.1399-3054.1975.tb03780.x
- [187] J.N. Pearson, Z. Rengel, Distribution and remobilization of zn and mn during grain development in wheat, *J. Exp. Bot.*, 45, **1994**, 1829–1835,

DOI:10.1093/jxb/45.12.1829

- [188] R. Nable, J. Loneragan, Translocation of Manganese in Subterranean Clover (*Trifolium subterraneum* L. Cv. Seaton Park) I. Redistribution During Vegetative Growth, *Funct. Plant Biol.*, 11, **1984**, 101, DOI:10.1071/PP9840101
- [189] R. Nable, J. Loneragan, Translocation of Manganese in Subterranean Clover (*Trifolium subterraneum* L. Cv. Seaton Park). II. Effect of Leaf Senescence and of Restricting Supply of Manganese to Part of a Split Root System, *Funct. Plant Biol.*, 11, **1984**, 113, DOI:10.1071/PP9840113
- [190] R.J. Bartlett, Manganese Redox Reactions and Organic Interactions in Soils, *Manganese in Soils and Plants*, R.D. Graham, R.J. Hannam, N.C. Uren (red.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, **1988**
- [191] N.J. Grundon, Nutrients Deficiency and Toxicity Symptoms, *Encyclopedia of Soil Science*, R. Lal (red.), Boca Raton, CRC Press, **2017**
- [192] Objawy niedoboru manganu: Mozaikowa chloroza na liściach pszenicy. <https://intermag.pl/uprawa-roslin/zalecenie-uprawowe/zalecenia-uprawowe-pszenica/niedobory-skladnikow>, dostęp dnia: 07/28/2022